

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen
von nichtribosomalen Peptidsynthetasen und
Prenyltransferasen in der Biosynthese von
Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Kathrin Mundt
aus Weißenfels**

Marburg/Lahn, 2013

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am 17.12.2013.

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen“

Albert Einstein

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Publikationen	VI
Erklärung	VIII
Abkürzungen und Fachbegriffe	IX
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Ascomycota	5
1.2 Die Gattung <i>Aspergillus</i>	5
1.2.1 Allgemeines	5
1.2.2 <i>A. clavatus</i>	6
1.2.3 <i>A. nidulans</i>	7
1.2.4 <i>N. fischeri</i>	8
1.3 Die Gattung <i>Penicillium</i>	9
1.3.1 Allgemeines	9
1.3.2 <i>P. chrysogenum</i>	10
1.4 Indolalkaloide	11
1.4.1 Allgemeines	11
1.4.2 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen	11
1.4.2.1 C2-prenylierte Indolalkaloide	12
1.4.2.2 C3-prenylierte Indolalkaloide	13
1.4.3 Fumitremorgin-Typ Indolalkaloide	14
1.5 Prenyltransferasen	16
1.5.1 Aromatische Prenyltransferasen	17
1.5.1.1 Prenyltransferasen der UbiA-Superfamilie	17
1.5.1.2 Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe	17
1.5.1.3 Prenyltransferasen der LtxC-Gruppe	18
1.5.1.4 Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie	18
1.6 Nichtribosomale Peptidsynthetasen	21
1.7 Aminooxidasen	24
2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	25
3. Material und Methoden	28
3.1 Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme	28
3.1.1 Chemikalien	28
3.1.2 Materialien zur Chromatographie	29
3.1.3 Enzyme und Kits	29

3.2 Plasmide, Primer, Mikroorganismen	30
3.2.1 Plasmide	30
3.2.2 Primer	33
3.2.3 Mikroorganismen	35
3.2.3.1 Bakterienstämme	35
3.2.3.2 Pilzstämme	35
3.3 Nährmedien und Puffer	36
3.3.1 Nährmedien	36
3.3.1.1 Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	36
3.3.1.2 Nährmedien zur Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	37
3.3.1.3 Nährmedien zur Kultivierung von <i>A. clavatus</i>	38
3.3.1.4 Nährmedien zur Kultivierung von <i>N. fischeri</i>	38
3.3.1.5 Nährmedien zur Kultivierung von <i>P. chrysogenum</i>	38
3.3.2 Antibiotika und Auxotrophiemarker	38
3.3.2.1 Antibiotika	38
3.3.2.2 Auxotrophiemarker	39
3.3.3 Puffer und Lösungen	39
3.3.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	39
3.3.3.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.3.3.3 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese	41
3.3.3.4 Puffer zur Proteinaufreinigung	41
3.3.3.5 Puffer und Lösungen zur Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamid Gel-elektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung	42
3.3.3.6 Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford- Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung	43
3.3.3.7 Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastierung und Transformation von <i>A. nidulans</i> TN02A7	43
3.4 Bioinformatische Methoden	45
3.5 Methoden der Mikrobiologie	45
3.5.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	45
3.5.2 Kultivierung von Ascomyceten	45
3.5.2.1 Kultivierung von <i>A. clavatus</i>	45
3.5.2.2 Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	45
3.5.2.3 Kultivierung von <i>N. fischeri</i>	46
3.5.2.4 Kultivierung von <i>P. chrysogenum</i>	46
3.5.3 Herstellung einer Sporensuspension	46
3.6 Methoden der Molekularbiologie	47
3.6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten	47
3.6.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion	47
3.6.1.2 DNA-Isolierung aus <i>A. nidulans</i> und seinen Transformanten	47
3.6.2 Isolierung von RNA aus <i>N. fischeri</i> und Herstellung von cDNA	48
3.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse)	48
3.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.6.5 Agarosegel-Elektrophorese	51
3.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
3.6.7 Restriktionsverdau	51
3.6.7.1 partielle Restriktion	51
3.6.8 Ligation von DNA-Fragmenten	52

3.6.9	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	53
3.6.9.1	Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	53
3.6.9.2	Herstellung ultra-kompetenter Zellen	53
3.6.9.3	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	54
3.6.10	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	54
3.6.10.1	Herstellung elektrokompeter Zellen	54
3.6.10.2	Elektroporation	54
3.6.11	Blau-Weiß-Selektion	55
3.6.12	Transformation von <i>A. nidulans</i> TN02A7 durch Protoplastierung	55
3.7	Methoden der Biochemie	56
3.7.1	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss	56
3.7.2	Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose	57
3.7.2.1	Rohextrakt-Herstellung	57
3.7.2.2	Zellextrakt-Gewinnung	57
3.7.3	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung	58
3.7.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	58
3.7.5	Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	59
3.7.6	Enzymatische Reaktionsansätze	59
3.7.6.1	BrePT-Aktivitätsassays	59
3.7.6.2	CdpC2PT-Aktivitätsassays	59
3.7.6.3	FtmPT3-Aktivitätsassays	60
3.7.6.4	Reaktionsansätze mit den putativen Prenyltransferasen EAW21072-His ₆ und EAW09999-His ₆	61
3.7.6.5	Reaktionsansätze mit der putativen Aminooxidase EAW25547-His ₆	61
3.7.6.6	Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte mit CdpC2PT-His ₆	61
3.7.6.7	Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte mit His ₈ -FtmPT3	62
3.8	Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten	62
3.8.1	Extraktion der Kulturüberstände von <i>A. nidulans</i> und Transformanten	62
3.9	Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen	62
3.9.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	62
3.9.1.1	Geräte und Säulen	62
3.9.1.2	Analytik der verschiedenen Reaktionsansätze	63
3.9.1.3	Isolierung der enzymatischen Produkte verschiedener Reaktionen	63
3.9.1.4	Analytik der Extrakte von <i>A. nidulans</i> und Transformanten	64
3.9.1.5	Isolierung aus den Transformanten von <i>A. nidulans</i> TN02A7	64
3.9.2	Massenspektrometrie (MS)	64
3.9.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	64
4.	Ergebnisse	65
4.1	Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus Ascomyceten	65
4.1.1	Einleitung	65
4.1.2	Charakterisierung der Prenyltransferase FtmPT3 aus <i>N. fischeri</i>	66
4.1.2.1	Sequenzanalysen von <i>ftmPT3</i>	66
4.1.2.2	Amplifikation von <i>ftmPT3</i> aus gDNA und cDNA von <i>N. fischeri</i>	68
4.1.2.3	Klonierung und Transformation	69
4.1.2.4	Überproduktion und Reinigung von His ₈ -FtmPT3	70

4.1.2.5 Aktivitätstest mit FtmPT3	71
4.1.2.6 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte mit His ₈ -FtmPT3	73
4.1.2.7 Biochemische Eigenschaften von His ₈ -FtmPT3 und Bestimmung der kinetischen Parameter	75
4.1.2.8 Ionenabhängigkeit der FtmPT3-Reaktion	77
4.1.3 Charakterisierung der Prenyltransferase CdpC2PT aus <i>N. fischeri</i>	78
4.1.3.1 Sequenzanalysen von <i>cdpC2PT</i>	78
4.1.3.2 Amplifikation von <i>cdpC2PT</i> aus gDNA und cDNA von <i>N. fischeri</i>	80
4.1.3.3 Klonierung und Transformation	81
4.1.3.4 Überproduktion und Reinigung von CdpC2PT-His ₆	82
4.1.3.5 Aktivitätstest mit CdpC2PT	83
4.1.3.6 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte mit CdpC2PT-His ₆	86
4.1.3.7 Biochemische Eigenschaften von CdpC2PT-His ₆ und Bestimmung der kinetischen Parameter	88
4.1.3.8 Ionenabhängigkeit der CdpC2PT-Reaktion	90
4.1.4 Analysen zur putativen Prenyltransferase NFIA_062330 aus <i>N. fischeri</i>	91
4.1.4.1 Einleitung	91
4.1.4.2 Amplifikation von NFIA_062330 aus gDNA von <i>N. fischeri</i>	93
4.1.4.3 Klonierung und Transformation	93
4.1.4.4 Überproduktion und Reinigung von EAW21072-His ₆	94
4.1.4.5 Aktivitätstest mit EAW21072	95
4.1.5 Analysen zur putativen Prenyltransferase ACLA_042210 aus <i>A. clavatus</i>	96
4.1.5.1 Einleitung	96
4.1.5.2 Amplifikation von ACLA_042210 aus gDNA von <i>A. clavatus</i>	98
4.1.5.3 Klonierung und Transformation	98
4.1.5.4 Überproduktion und Reinigung von EAW09999-His ₆	99
4.1.5.5 Aktivitätstest mit EAW09999	100
4.2 Analysen zur putativen Aminooxidase NFIA_043660 aus <i>N. fischeri</i>	101
4.2.1 Sequenzanalysen von NFIA_043660	101
4.2.2 Amplifikation von NFIA_043660 aus gDNA von <i>N. fischeri</i>	102
4.2.3 Klonierung und Expression in <i>E. coli</i> M15, SG13009, XL1-Blue MRF ^c	103
4.2.4 Klonierung und Expression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	108
4.3 Untersuchungen zu nichtribosomalen Peptidsynthetasen aus Ascomyceten	110
4.3.1 Einleitung	110
4.3.2 Charakterisierung der NRPS Pc21g15480 aus <i>P. chrysogenum</i>	111
4.3.2.1 Amplifikation des NRPS-Gens Pc21g15480 und des <i>gpdA</i> -Promotorbereiches	111
4.3.2.2 Klonierung und Transformation	112
4.3.2.3 Transformation in <i>A. nidulans</i> TN02A7	114
4.3.2.4 Kultivierung und Analyse der Transformanten	114
4.3.2.5 Strukturaufklärung der isolierten Produkte	116
4.3.3 Untersuchungen zu der NRPS NFIA_074300 aus <i>N. fischeri</i>	118
4.3.3.1 Amplifikation von NFIA_074300 aus gDNA von <i>N. fischeri</i>	118
4.3.3.2 Klonierung und Transformation in <i>E. coli</i>	118
4.3.3.3 Transformation in <i>A. nidulans</i> TN02A7	120
4.3.3.4 Kultivierung und Analyse der Transformanten	121
4.3.3.5 Strukturaufklärung der isolierten Produkte	122
4.3.3.6 Analyse des Pilzstammes <i>A. nidulans</i> TN02A7	124
4.3.4 Untersuchungen zur Koexpression von Prenyltransferasen und NRPS in <i>A. nidulans</i> TN02A7	126
4.3.4.1 Einleitung	126
4.3.4.2 Amplifikation von <i>cdpC2PT</i> und <i>cdpC3PT</i>	127

4.3.4.3 Klonierung und Transformation	127
4.3.4.4 Protoplastierung von <i>A. nidulans</i> CaW03 (<i>ftmPS</i>)	130
4.3.4.5 Kultivierung und Analyse der Transformanten	131
4.3.4.6 Strukturaufklärung der entstandenen Sekundärmetabolite	134
5. Diskussion	136
5.1 Die Verruculogen-Prenyltransferase FtmPT3 aus <i>N. fischeri</i>	136
5.2 Die reverse C2-Prenyltransferase CdpC2PT aus <i>N. fischeri</i>	139
5.3 Die putative Fellutanin-Aminooxidase EAW25547 aus <i>N. fischeri</i>	141
5.4 Die putativen Prenyltransferasen EAW21072 aus <i>N. fischeri</i> und EAW09999 aus <i>A. clavatus</i>	142
5.5 Die nichtribosomalen Peptidsynthetasen Pc21g15480 aus <i>P. chrysogenum</i> und NFIA_074300 aus <i>N. fischeri</i>	144
5.6 Die gezielte <i>in vivo</i> Koexpression der NRPS <i>ftmPS</i> mit den Prenyltransferasen <i>cdpC2PT</i> oder <i>cdpC3PT</i>	146
6. Referenzen	149
7. Anhang	166
7.1 Muti-Proteinsequenzvergleiche ausgewählter Prenyltransferasen zur Unterstützung der Intron-Exon Vorhersage	166
7.1.1 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit FtmPT3	166
7.1.2 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit CdpC2PT	168
7.1.3 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit EAW21072	169
7.1.4 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit EAW09999	170
7.2 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus den FtmPT3-Reaktionen	171
7.3 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus den CdpC2PT-Reaktionen	174
7.4 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanz cyclo-L-Trp-L-His aus den Transformanten <i>A. nidulans</i> KM01-03 (<i>Pc21g15480</i>)	180
7.5 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanz Pseurotin A aus dem Transformant <i>A. nidulans</i> KM12 (<i>NFIA_074300</i>)	181
7.6 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus den Transformanten <i>A. nidulans</i> KM19 (<i>cdpC2PT</i>) und KM24 (<i>cdpC3PT</i>)	182
Danksagung	186
Curriculum vitae	187

Publikationen

Kathrin Mundt and Shu-Ming Li (2013), CdpC2PT, a reverse prenyltransferase from *Neosartorya fischeri* with a distinct substrate preference from known C2-prenyltransferases, *Microbiology*, Volume 8, 2169-2179, DOI: 10.1099/mic.0.069542-0.

Kathrin Mundt, Beate Wollinsky, Han-Li Ruan, Tianjiao Zhu and Shu-Ming Li (2012), Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical and biochemical approaches, *ChemBioChem*, Volume 13, Issue 17, 2583-2592, DOI: 10.1002/cbic.201200523.

Kathrin Mundt^a, Carsten Wunsch^a, Beate Wollinsky and Shu-Ming Li (2013), Targeted Coexpression of the NRPS FtmPS and different prenyltransferases in *A. nidulans*, in Vorbereitung.

^a: Diese Autoren haben gleichermaßen zu der Arbeit beigetragen.

Präsentationen bei Tagungen

Kathrin Mundt, Beate Wollinsky, Han-Li Ruan, Qianqun Gu and Shu-Ming Li
Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical and biochemical approaches
Posterpräsentation, 1. Europäische Naturstoffkonferenz (Dechema), 22.-25. September 2013, Frankfurt (am Main)

Kathrin Mundt, Carsten Wunsch, Julia Winkelblech, Shu-Ming Li
Nichtribosomale Peptidsynthetasen und Prenyltransferasen als Instrument zur Herstellung neuer Wirkstoffe
Posterpräsentation, Evaluation des LOEWE-Programmes, 15. August 2012, Marburg (MPI)

Carsten Wunsch, **Kathrin Mundt**, Xia Yu und Shu-Ming Li
Nichtribosomale Peptidsynthetasen und Prenyltransferasen als Instrument zur Herstellung neuer Wirkstoffe
Posterpräsentation, Synthetische Mikrobiologie - Perspektiven für Biotechnologie und Pharmazie (SynMikro-Fachtagung), 04. Mai 2011, Marburg (Alte Aula)

Besuchte Workshops

Bioinformatik Workshop in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro)

18. Oktober 2011, Marburg (LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie, Mehrzweckgebäude)

Workshop zur Etablierung einer PCR-basierten Detektionsmethode für potentielle mykotoxin-produzierende Schimmelpilze auf TCM-Drogen

September – Oktober 2010, The Research Centre of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of TCM, Guangzhou (China)

Wissenschaftliche Vorträge

Kathrin Mundt

Investigation on fungal NRPS and prenyltransferases involved in the biosynthesis of secondary metabolites

Vortragsreihe über aktuelle Ergebnisse in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro),
28. Juni 2012, Marburg (MPI)

Kathrin Mundt

Transcriptional Regulatory Elements in Fungal Secondary Metabolism (Yin & Keller 2011)

Literaturseminar in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro), 19. Januar 2012, Marburg (MPI)

Kathrin Mundt

Angewandte bioinformatische Methoden in der Arbeitsgruppe von Prof. Shu-Ming Li

Bioinformatik Workshop in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro),

18. Oktober 2011, Marburg (LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie, Mehrzweckgebäude)

Kathrin Mundt

Investigation on fungal NRPS and prenyltransferases involved in the biosynthesis of secondary metabolites

Vortragsreihe über aktuelle Ergebnisse in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro),
16. Juni 2011, Marburg (MPI)

Kathrin Mundt, Shu-Ming Li

Production of prenylated peptides by synthetic biological approach

Seminarreihe in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro), 05. Mai 2011, Marburg (MPI)

Kathrin Mundt

Genome transplantation in bacteria: changing one species to another (Lartigue *et al.*, 2007)

Literaturseminar in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro), 27.01.2011, Marburg (MPI)

Kathrin Mundt

Investigation on fungal NRPS and prenyltransferases involved in the biosynthesis of secondary metabolites

Vortragsreihe über aktuelle Ergebnisse in Synthetischer Mikrobiologie (SynMikro),
10. Juni 2010, Marburg (MPI)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von nichtribosomalen Peptidsynthetasen und Prenyltransferasen in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten “ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Kathrin Mundt)

Abkürzungen und Fachbegriffe

Für Maßeinheiten wurde das Internationale Einheitensystem (SI; *Système international d'unités*) und die davon abgeleiteten Einheiten verwendet. Aminosäuren wurden mit dem Ein - Buchstaben-Code der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ abgekürzt. Akronyme und Abkürzungen sind im Text an entsprechender Stelle erläutert, wenn sie für das weitere Verständnis notwendig sind.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acc. No.	Accession number (Kennnummer)
<i>A. clavatus</i>	<i>Aspergillus clavatus</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
AMM	Aspergillus Minimal Medium
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BCRP	breast cancer resistance protein
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
br	breit
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
C	Cytosin
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
Carb	Carbenicillin
CDH	Czapec Dox Hefeextrakt
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
d	Duplett
Da	Dalton
dd	Duplett vom Duplett
ddd	Duplett vom Duplett vom Duplett
ddt	Duplett vom Duplett vom Triplet
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMAT	Dimethylallyltryptophan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Deoxyribonuclease I (Desoxyribonuklease I)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dt	Duplett vom Triplet
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
EI	Elektronenstoß-Ionisation

ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FAD ⁺ /FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
FMN ⁺ /FMNH ₂	Flavinmononukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
FPLC	Fast protein liquid chromatography
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GMM	Glucose Minimal Medium
<i>gpdA</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase
His ₆	Hexahistidin
His ₈	Oktahistidin
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
l	Liter
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
LaeA	loss of <i>aflR</i> expression- <u>A</u> (Verlust der <i>aflR</i> Expression)
LB	Lysogeny broth
M	molar
m	Multiplett
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MFS	Major Facilitator Superfamilie
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺ / NADH	Nikotinamadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP ⁺ /NADPH	Nikotinamadenindinukleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
<i>N. fischeri</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
OD	Optische Dichte
p	Promotor
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>P. fellutanum</i>	<i>Penicillium fellutanum</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDAS	Potatoe-Dextrose Sucrose Agar Medium
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
Primer	Oligonukleotid
<i>pyrG</i>	Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase Gen
<i>pyroA4</i>	Auxotrophie-mutation in <i>A. nidulans</i> , Pyridoxin-Biosynthesegen
rpm	rotations per minute
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

RNase A	Ribonuclease A (Ribonuklease A)
RP	reverse phase
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
t	Triplett
T	Thymin
T _a	Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
td	Triplett vom Duplett
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TrpC	Terminator von <i>Aspergillus nidulans</i>
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat
U	Unit
UV	ultraviolett
üN	über Nacht
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
V	Volt
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
× g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β- D -galactosid
YAG	Yeast Agar Glucose (Hefeextrakt-Agar-Glucose Medium)
YME	Yeast Malt Extract (Hefeextrakt-Malzextrakt Medium)

Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution, haben Mikroorganismen die Fähigkeit entwickelt, eine Vielzahl an strukturell vielseitigen und komplexen Substanzen zu bilden. Unter bestimmten Umweltbedingungen werden Biosynthesewege von komplexen Metaboliten induziert, die wiederum oft eine toxische Wirkung gegenüber den konkurrierenden Organismen zeigen. Vor Allem die Sekundärmetabolit-Produktion von filamentösen Pilzen stellt dabei eine wichtige Quelle von biologisch aktiven Stoffen dar, welche zum Nutzen der menschlichen Gesundheit eingesetzt werden können. Insbesondere die Enzymklassen der Polyketidsynthasen (PKS), nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und NRPS/PKS-Hybride sind für die Synthese von neuen Naturstoffen verantwortlich, welche großes therapeutisches Potential (Antimykotika, Antibiotika, Immunsuppressiva) besitzen. Die metabolisierten Naturstoffe, können weiterführend durch z.B. Prenyltransferasen modifiziert und somit die Strukturvielfalt enorm gesteigert werden. Für die Entdeckung und Entwicklung neuer Arzneistoffe ist das Verstehen von Reaktionsmechanismen einzelner Enzyme in der Natur zwingend notwendig und dafür sind vor allem biochemische Untersuchungen von großer Bedeutung.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Funktionen von zwei unbekannten Prenyltransferasen (FtmPT3, CdpC2PT) aus *Neosartorya fischeri* (*N. fischeri*) aufgeklärt. Das Gen *ftmPT3*, codiert für eine Prenyltransferase, welche in Anwesenheit von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) die Prenylierung von Verruculogen an OH-13 katalysiert und somit die lang gesuchte *O*-Prenyltransferase innerhalb der Fumitremorgin A-Biosynthese darstellt. Intensive Sequenzuntersuchungen zu *ftmPT3* und der angrenzenden Nachbargene, wiesen im Vergleich zu *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) einen zusätzlichen Genbereich mit einer Größe von 9,6 kb und sieben Genen auf. Das Protein CdpC2PT, wies Sequenzidentitäten von 40 % mit der C2-Prenyltransferase BrePT aus *Aspergillus versicolor* und 42 % mit NotF aus *Aspergillus sp.* auf. Die Analyse der Reaktionsgemische von CdpC2PT mit DMAPP, zeigte die Akzeptanz zyklischer Dipeptide mit Substratpräferenz zu (*S*)-Benzodiazepindion und cyclo-L-Trp-L-Trp auf. Durch die Analyse der enzymatischen Produkte mittels NMR und MS, konnte CdpC2PT eindeutig als eine reverse C2-Prenyltransferase nachgewiesen werden, welche außerdem die Mono- und Di-Prenylierung von cyclo-L-Trp-L-Trp katalysiert. Literaturrecherche nach bekannten Naturstoffen wies die Existenz von mono- und diprenylierten cyclo-L-Trp-L-Trp Derivaten (Fellutaninen) in *Penicillium fellutanum* (*P. fellutanum*) nach und lässt folglich die Beteiligung von CdpC2PT in der Fellutanin-Biosynthese in *N. fischeri* vermuten. Die Sequenzanalyse der Nachbargene zeigte das Vorhandensein einer putativen Aminooxidase EAW25547 auf, welche in der Fellutanin-Biosynthese mitwirken könnte. Dieses Gen *NFIA_043660* wurde aus der

genomischen DNA (gDNA) von *N. fischeri* amplifiziert und in die beiden Expressionsvektoren pQE60 und pHIS8 kloniert. Nach der Untersuchung verschiedener Expressionsbedingungen konnte jedoch keine Proteinüberproduktion festgestellt werden.

Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit, die letzte putative Prenyltransferase aus *N. fischeri* codierend durch *NFIA_062330* untersucht. Sequenzanalysen ergaben ein orthologes Gen *ACLA_042210* in *Aspergillus clavatus* (*A. clavatus*) mit einer 62 %igen Übereinstimmung auf Aminosäureebene. Die Gene *ACLA_042210* und *NFIA_062330* konnten jeweils aus gDNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE60 kloniert werden. Die Überexpression der Gene wurde erfolgreich in dem für die Expression von pQE60-Konstrukten optimierten Stamm *E. coli* M15 [pREP4] durchgeführt. Für beide Enzyme wurde eine Vielzahl an diversen Substraten getestet, doch leider konnte bisher keine Aktivität nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die homologen NRPS-Gene *Pc21g15480* aus *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*) und *NFIA_074300* aus *N. fischeri* *in vivo* funktionell untersucht. Beide Gene wurden erfolgreich aus gDNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pJW24 überführt. Nach Protoplastierung und Transformation des Wildtyps *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) TN02A7 mit den Expressionskonstrukten wurde die Integration der Gene für einige Transformanten mittels PCR-Screening nachgewiesen. Nach Extraktion der Kulturen der *Pc21g15480*-Transformanten konnte die deutliche Akkumulation zweier neuer Substanzen im Vergleich zum Wildtyp *A. nidulans* TN02A7 beobachtet werden. Nach Isolierung des ersten Produktes konnte mittels NMR- und MS-Analysen cyclo-L-Trp-L-His nachgewiesen werden. Die Untersuchung der *NFIA_074300*-Transformanten zeigte hingegen nur einen Transformanten mit einer zusätzlichen Produktbildung im Vergleich zu *A. nidulans* TN02A7 auf. Diese Substanz wurde mittels NMR und MS überraschenderweise als das PKS/NRPS-Produkt Pseurotin A identifiziert werden und stellte nicht die erwartete Substanz dar.

Ein weiteres Projekt beschäftigte sich mit der gezielten Koexpression der Prenyltransferasegene *cdpC2PT* oder *cdpC3PT* mit dem NRPS-Gen *ftmPS* aus *N. fischeri*. Die codierenden Gene *NFIA_043650* und *NFIA_074280* wurden nach der entsprechenden Amplifikation in das Expressionskonstrukt pCaW34 eingebracht. Nach der *in vivo* Synthese von cyclo-L-Trp-L-Pro (Brevianamid F) durch die NRPS FtmPS, wurden die Expressionskonstrukte in den Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) eingebracht. Die ektopische Integration der Gene wurde durch PCR-Screening der erhaltenen Transformanten bestätigt. Die Analyse der Sekundärstoffproduktion mittels HPLC zeigte, eine deutliche Produktbildung in den einzelnen Transformanten auf. Anschließend erfolgte die Strukturaufklärung der einzelnen Produkte mit Hilfe der MS- und NMR-Analyse. Durch die Koexpression von *ftmPS* mit *cdpC2PT* oder *cdpC3PT* *in vivo*, konnten gezielt neue prenylierte cyclo-L-Trp-L-Pro Derivate durch die synthetische Biologie hergestellt werden.

Summary

In the course of evolution, microorganisms have developed the ability for production of a multiplicity of structural diverse and complex compounds. Under given environmental conditions, biosynthetic pathways are induced to synthesize complex metabolites that are often toxic toward their competing organisms. Especially production of secondary metabolites of filamentous fungi is one of the most important source of biological active substances, which can be used for the benefit of human health. Notably, the enzyme classes of polyketide synthases (PKS), nonribosomal peptide synthetases (NRPS) and NRPS/PKS-hybrids are responsible for the production of novel natural products that exhibit considerable therapeutic potential, *e.g.* antibiotics, antifungal and immunosuppressive drugs. These natural products can be further modified by other enzymes *e.g.* prenyltransferases, consequently leading to a huge structural diversity. For discovery and development of new drugs, understanding of reaction mechanism of enzymes in nature is mandatory and especially biochemical investigations become more important.

In this thesis, functions of two unknown prenyltransferases (FtmPT3, CdpC2PT) of *Neosartorya fischeri* (*N. fischeri*) were biochemically identified and characterised. The gene *ftmPT3*, encodes a prenyltransferase, which catalyses in the presence of DMAPP the prenylation of verruculogen at OH-13 and therefore acts as the long-time missing *O*-prenyltransferase in the fumitremorgin A biosynthesis. Intensive sequence analyses of *ftmPT3* and its adjacent neighbour genes revealed, in comparison to *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), an additional locus with a size of 9.6 kb and seven putative genes. The protein CdpC2PT, shows sequence identities of 40 % with the C2-prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* and 42 % with NotF from *Aspergillus sp.* on the amino acid level. Investigations of reaction mixtures of CdpC2PT with DMAPP, showed a broad substrate specificity towards cyclic dipetides with preference for (*S*)-benzodiazepindione and cyclo-L-Trp-L-Trp. NMR and MS analyses of the enzymatic products revealed unequivocally that CdpC2PT acts as a reverse C2-prenyltransferase and catalyses the mono- and diprenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp. Literature search showed the existence of mono- and diprenylated derivatives of cyclo-L-Trp-L-Trp in *Penicillium fellutanum* (*P. fellutanum*), so-called fellutanines. Therefore, it can be speculated that CdpC2PT could be involved in the biosynthesis of fellutanines in *N. fischeri*. Sequence analyses of the neighbour genes revealed the existence of a putative amino oxidase EAW25547, which could contribute to the biosynthesis of fellutanines. The coding gene *NFIA_043660* was successfully amplified from genomic DNA

(gDNA) of *N. fischeri* and subsequently cloned into both expression vectors pQE60 and pHIS8. After incubation under different expression conditions no protein overproduction could be shown.

Furthermore, the gene *NFIA_062330*, encoding for the last unknown putative prenyltransferase of *N. fischeri*, was biochemically investigated. Sequence analyses revealed an orthologous gene *ACLA_042210* in *Aspergillus clavatus* (*A. clavatus*), with a sequence identity of 62 % on the amino acid level. Both genes *NFIA_062330* and *ACLA_042210* were amplified from gDNA and cloned into the expression vector pQE60. Expression of the genes was carried out successfully in the optimized overexpression *E. coli* strain M15 [pREP4]. Unfortunately no activity could be detected after testing a number of different substrates.

Another project focused on the function of two homologous NRPS genes *Pc2Ig15480* of *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*) and *NFIA_074300* of *N. fischeri*. Both genes were amplified from gDNA and successfully cloned into the expression vector pJW24. After protoplastation and transformation of the wildtype *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) TN02A7 with the expression constructs, integration of genes was proven by PCR screening. After extraction of *Pc2Ig15480* transformants, cyclo-L-Trp-L-His was detected by HPLC and NMR analyses. Analysis of the *NFIA_074300* transformants revealed, that one transformant produced an additional product peak in comparison to the wildtype. Surprisingly this substance was identified by NMR and MS analyses as pseurotin A, a product of a NRPS/PKS-hybrid and was not the expected substance.

In addition, production of secondary metabolites by targeted co-expression of prenyltransferases genes with a NRPS gene was carried out in the dissertation. The genes *NFIA_043650* and *NFIA_074280*, encoding for the prenyltransferases CdpC2PT and CdpC3PT, respectively, were primarily amplified from gDNA and afterwards cloned into the expression construct pCaW34. The expression constructs were transferred into transformant *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*). PCR screening of the transformants confirmed the ectopic integration of the prenyltransferase genes into the genome. HPLC analysis revealed clearly product accumulation in the resulted transformants and showed the successful strategy for production of biologically active substances by synthetic biology. Structure elucidation of the isolated products was carried out by NMR and MS analyses.

1. Einleitung

1.1 Ascomycota

Die Abteilung der Schlauchpilze (Ascomycota) stellt mit insgesamt mehr als 32,000 bekannten Arten verteilt auf 3,400 Gattungen, die größte Abteilung im gesamten Pilzreich dar (Kirk *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass die Mehrzahl bislang noch nicht entdeckt wurde und sich die Gesamtzahl wahrscheinlich auf 1,5 Millionen Species beläuft (Hawksworth 2001). Zusammen mit den Ständerpilzen (Basidiomycota) bilden die Ascomycota das Unterreich der Dikarya (James *et al.*, 2006). Die Bezeichnung Ascomycota stammt dabei von den griechischen Wörtern *askos* (Schlauch) und *mykes* (der Pilz) ab. Ein charakteristisches Merkmal sind die in einer schlauchartige Struktur eingeschlossenen sexuellen (teleomorphen) Ascosporen, die im Allgemeinen aktiv ausgestoßen werden. Die ungeschlechtliche (anamorphe) Fortpflanzung erfolgt dagegen über die Conidiosporen. Da bei einigen Arten bisher nur die anamorphe Fortpflanzung nachgewiesen wurde, werden unter dem Begriff „fungi imperfecti“ oder auch Deuteromycota zusammengefasst (Adrio 2003; Campbell & Reece 2003). Schlauchpilze selbst sind aus Mycel aufgebaut, das aus langen und dünnen Zellfäden (Hyphen) oder aus Einzelzellen mit kurzen Sprossmycelien besteht.

Die Schlauchpilze zeichnen sich außerdem durch eine vielfältige Lebensweise aus. Je nach Art der Nährstoffaufnahme werden sie in endotrophe, saprotrophe, nekrotrophe und biotrophe Parasiten von Pflanzen, Tieren und Menschen unterschieden (Webster & Weber 2007). Für den Menschen haben Pilze der Abteilung Ascomycota eine vielfältige Bedeutung. Zum Einem können einige Vertreter als Pathogene fungieren und somit verschiedenste Symptome bei Menschen, Tieren und Pflanzen hervorrufen. Und zum Anderem zeichnen sie sich durch ihre mannigfaltigen Eigenschaften aus, welche für die Medizin und Biotechnologie von großem Interesse sind. Zur Abteilung der Ascomycota gehören beispielsweise die Familie der Arthrodermataceae und Clavicipitaceae, sowie die Familie der Trichocomaceae mit den Gattungen *Aspergillus*, *Neosartorya* und *Penicillium*.

1.2 Die Gattung *Aspergillus*

1.2.1 Allgemeines

Die erste Überlieferung eines Schimmelpilzes, dessen mikroskopisches Bild einem Weihwasserwedel oder Aspergill ähnelte, geht auf den italienischen Botaniker und Priester Pier Antonio Micheli im Jahre 1729 zurück. Seine Entdeckung stellt einen Meilenstein in der

Erforschung von Pilzen dar und beschrieb zum ersten Mal die einzigartige Morphologie des gießkannenförmigen Konidiophors (Micheli 1729). Pilze dieser Gattung gehören zu der Familie der Trichocomaceae und kommen vorwiegend im Boden auf abgestorbenem organischem Material vor. Derzeit sind mehr als 250 verschiedene *Aspergillus*-Arten bekannt (Geiser *et al.*, 2007), welche sich anhand molekulargenetischer Analysen in 8 Untergattungen (*Aspergillus*, *Candidi*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Ornati*, *Terrei*, *Warcupi*) und 22 Sektionen einteilen lassen (Varga & Samson 2008). Dabei sind die Vertreter dieser Gattung von immenser Bedeutung, insbesondere im Hinblick für die Lebensmittelherstellung und Pharmaindustrie. Bereits seit über 1000 Jahren werden die Arten *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) und *Aspergillus sojae* (*A. sojae*) in Japan und China zur Herstellung von Lebensmitteln wie Sake oder Soja-Sauce eingesetzt (Biesebeke & Record 2008). Die Produktion von Itaconsäure (Abb.1-1) durch *Aspergillus itaconicus* (*A. itaconicus*) und *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) wird hingegen zur Papier- und Textilherstellung verwendet (Steiger *et al.*, 2013). Außerdem wird heutzutage durch die Fermentation von *Aspergillus niger* (*A. niger*) fast der gesamte Bedarf an Zitronensäure gewonnen, welche als Ansäuerungsmittel in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie, sowie als Lebensmittelzusatz ihre Verwendung findet (Soccol *et al.*, 2006). Für die Pharmaindustrie zeichnen sich vor Allem verschiedene Stämme von *A. terreus* zur Gewinnung von Arzneistoffen wie Lovastatin (Abb.1-1) und Cyclosporin A aus, welche die Senkung des Blut-Cholesterinspiegels bewirken und als Immunsuppressivum bei Organ-Transplantationen eingesetzt werden (Hajjaj *et al.*, 2001; Sallam *et al.*, 2003). Neben den positiven Nutzeffekt der Pilze und ihrer Sekundärmetabolite, zählen auch einige Vertreter zu der Gattung, die oft Allergien auslösen können und als Erreger der oft tödlichen Aspergillose bei immunsupprimierten Menschen gelten (Latge 1999; Sallam *et al.*, 2003; Speth *et al.*, 2008). Um ein besseres Verständnis von der Pathogenese der einzelnen Erreger zu erhalten, wurde vor einigen Jahren mit der intensiven Gen- und Genomanalyse verschiedener Arten begonnen (Archer & Dyer 2004; Galagan *et al.*, 2005). Die vorliegende Arbeit basiert auf der Verwendung der *Aspergillus*-Arten *Aspergillus clavatus* (*A. clavatus*), *Neosartorya fischeri* (*N. fischeri*) und *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*), welche nachstehend vorgestellt werden.

1.2.2 *A. clavatus*

A. clavatus ist ein hauptsächlich in mediterranen und tropischen Gebieten vorkommender saprophytischer Schimmelpilz. *A. clavatus* ist ein naher Verwandter von *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) und zählt zu den verbreitetsten Pilzpathogenen in der USA. Der Pilz ist besonders auf getrockneten Früchten, Nüssen, sowie im Boden und auf tierischen Exkrementen

vorzufinden und ist in der Lage verschiedene Getreidearten wie z.B. Hirse oder Reis zu befallen, wodurch leichte Allergien beim Menschen ausgelöst werden können. *A. clavatus* produziert eine Vielzahl an Mykotoxinen (Abb.1-1) wie Cytochalasin E, Patulin (Lopez-Diaz & Flannigan 1997), Tryphtiquivalin (Gao *et al.*, 2011) und wird häufig in Verbindung mit der tödlichen Neurotoxikose bei Schafen und Rindern genannt (Fedorova *et al.*, 2008). Aufgrund der stark toxischen Wirkung von Patulin gegenüber Bakterien und höheren Organismen, kann es nicht für therapeutische Zwecke eingesetzt werden (Schumacher 2005). *In vivo* Untersuchungen an Mäusen wiesen hingegen für Cytochalasin E eine Inhibition der Angiogenese und eine Antitumoraktivität bei Lewis-Lungentumoren nach (Udagawa *et al.*, 2000). Seit den 1930er Jahren ist der Pilz außerdem als Hauptauslöser der exogenen allergischen Alveolitis, auch als Malzarbeiterlunge bezeichnet, bekannt. Das Genom des Referenzstammes *A. clavatus* NRRL1 wurde vollständig sequenziert und annotiert. Es umfasst eine Größe von 27,86 Mb mit 9,379 putativen Genen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/119502700>). In den vorhandenen 35 Genclustern wurden Gene für 12 putative nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) und 3 Prenyltransferasen der Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) Superfamilie postuliert (Khaldi *et al.*, 2010).

1.2.3 *A. nidulans*

A. nidulans ist die im Labor meist untersuchte Spezies aus der Gattung *Aspergillus* und ist seit mehr als 60 Jahren einer der bedeutendsten Modelorganismen für die Erforschung der eukaryotischen Genregulation (Wortman *et al.*, 2009). Die bekanntesten molekularbiologischen Techniken für die genetische Manipulation von Ascomyceten, wurden zuerst anhand von *A. nidulans* entwickelt, bevor sie ihre Anwendung bei anderen Pilzvertretern fanden. Durch das Vorhandensein von effizienten Expressionssystemen für *A. nidulans*, stellt der Pilz derzeit eines der wichtigsten Instrumente für die heterologe Expression von Genen der Sekundärmetabolite wie z.B. NRPS dar (Chiang *et al.*, 2013). Der Pilz besitzt wie sein naher Verwandter *N. fischeri* einen sexuellen und asexuellen Lebenszyklus und ist somit durch eine teleomorphe (*Emericella nidulans*) und anamorphe Form (*A. nidulans*) gekennzeichnet. Derzeit existiert eine Vielzahl an diversen Wildtyp- und zusätzlichen Deletionsstämmen (Nayak *et al.*, 2006), wobei die meisten jedoch von dem sogenannten Glasgow-Stamm abgeleitet sind (Pontecorvo *et al.*, 1953). Als krankheitsauslösendes Pathogen wird *A. nidulans* in den eher seltensten Fällen genannt, er konnte jedoch mit der beim Menschen auftretenden chronischen granulomatösen Entzündung in Verbindung gebracht werden (Segal *et al.*, 1998). Durch die Isolierung von

Substanzen wie z.B. Sterigmatocystin (Brown *et al.*, 1996), Penicillin (Brakhage *et al.*, 1992), Asperfuranon (Chiang *et al.*, 2009), Asperthecin (Szewczyk *et al.*, 2008), Asterriquinon (Schneider *et al.*, 2008), Austinol und Dehydroaustinol (Lo *et al.*, 2012), sowie Aspernidin und Emodin-Derivaten (Chiang *et al.*, 2010; Scherlach *et al.*, 2010), stellt der Pilz zudem einen wichtigen Produzenten von interessanten Sekundärmetaboliten dar (Abb.1-1). Das Genom von *A. nidulans* FGSC A4 wurde 2005 komplett sequenziert und annotiert. Es ist durch eine Größe von 30,2 Mb charakterisiert und erstreckt sich auf 8 Chromosomen. Es konnten insgesamt 10,597 putative Gene identifiziert werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AACD000000000.1>). Die 46 postulierten Gencluster umfassen dabei Gene für 11 putative nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) und 6 Prenyltransferasen der Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) Superfamilie (Khaldi *et al.*, 2010).

1.2.4 *N. fischeri*

N. fischeri ist ein im Boden ubiquitär verbreiteter Schimmelpilz der Ordnung Eurotiales und gehört zur Familie der Trichocomaceae. Der filamentöse Pilz wächst hauptsächlich saprophytisch und ist auf faulenden Lebensmitteln die Früchte enthalten vorzufinden. Die anamorphe Form (asexuelle Reproduktionsphase) von *N. fischeri* wird als *Aspergillus fischerianus* (*A. fischerianus*) bezeichnet und herrscht vorwiegend bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C vor, bei einer Temperatur von 25 °C überwiegt die teleomorphe Form (sexuelle Reproduktionsform) (Samson *et al.*, 2007). Die teleomorphe Form bildet dabei hitzeresistente Ascosporen aus, welche von verdorbenen Früchten isoliert werden können, nachdem sie mit Hitze behandelt wurden (Conner & Beuchat 1987). *N. fischeri* wurde nur sehr selten in Verbindung mit Infektionen bei Menschen und Tieren genannt. Bisher sind Fälle von mykotischer Keratitis sowie Endokarditis (Coriglione *et al.*, 1990; Summerbell *et al.*, 1992) und Lungen-Aspergillose bei Transplantationspatienten (Lonial *et al.*, 1997) beschrieben. *N. fischeri* ist in der Lage Substanzen wie Acetylaszonalenin (Abb.1-1), Fiscalin, Fischerin, Neosartorin, Sarcin, Terrein, Tryptoquivalin A und Trypacidin zu produzieren (Samson *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009b), jedoch ist es aber hauptsächlich für seine Mykotoxin-Produktion der Fumitremorgin-Gruppe bekannt. Hierzu werden unter anderem die Fumitremorgine A, B und C, sowie Verruculogen und Verruculogen TR-2 gezählt (Nielsen *et al.*, 1988; Samson *et al.*, 2007), welche für den Menschen gesundheitsgefährdend sein können (Larsen *et al.*, 2007). Das Genom von *N. fischeri* NRRL181 konnte 2006 vollständig sequenziert und annotiert werden. Es besitzt eine Größe von 31,77 Mb, die sich auf 8 Chromosomen

erstecken. Es konnten insgesamt 10,678 putative Gene identifiziert werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AAKE00000000>). Die 39 Gencluster umfassen dabei Gene für 19 putative nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) und 10 Prenyltransferasen der Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) Superfamilie (Khaldi *et al.*, 2010).

1.3 Die Gattung *Penicillium*

1.3.1 Allgemeines

Die zur Gattung *Penicillium* zählenden Schimmelpilze, zeichnen sich besonders durch die Morphologie ihres pinselförmigen Konidophors aus und werden deshalb auch als Pinselschimmel angegeben. *Penicillium*-Arten sind vorwiegend in verschiedenen Nahrungsmitteln vorzufinden (Rundberget *et al.*, 2004). Neben der Gattung *Aspergillus* stellen die *Penicillium*-Vertreter die wichtigsten Mikroorganismen für die Biotechnologie dar (Webster & Weber 2007). So sind besonders *Penicillium roqueforti* (*P. roqueforti*) und *Penicillium cameberti* (*P. cameberti*) für die Produktion von Blauschimmelkäse und Cambertschimmelkäse von enormer Bedeutung (Jakobsen *et al.*, 2002). Jedoch können einige Arten Mykotoxine produzieren, die eine schädliche Wirkung auf den Menschen haben können. Hierzu zählen unter anderem die nephrotoxischen Ochratoxine, welche bevorzugt von den auf Getreide, in Äpfeln und Fleischprodukten vorkommenden Arten *Penicillium verrucosum* (*P. verrucosum*), *Penicillium expansum* (*P. expansum*) und *Penicillium nordicum* (*P. nordicum*) (Andersen *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2001) gebildet werden. Dabei kann der Verzehr kontaminierter Lebensmittel zu einer letalen Nierenerkrankung (Balkan-Nephropathie) oder Gallenblasenkrebs führen (O'Brien & Dietrich 2005; Stoev 1998). Als Krankheitserreger werden oft die Sporen als Asthma Auslöser genannt (Licorish *et al.*, 1985). Zudem wird *Penicillium marneffei* (*P. marneffei*) oft in Verbindung mit HIV-Patienten aus dem südostasiatischen Raum gebracht (Sirisanthana & Sirisanthana 1995). Andererseits kann durch die Synthese biologisch aktiver Substanzen die Gattung *Penicillium* auch einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Menschen haben. Durch die Entdeckung des wichtigsten Antibiotikums Penicillin, erlangte die Gattung eine enorme Bedeutung für die Pharmaindustrie. Der erste Vertreter der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Mevastatin, wurde unter Anderem aus *Penicillium citrinum* (*P. citrinum*) isoliert (Endo *et al.*, 1976). Das Sekundärmetabolit Griseofulvum konnte bereits 1939 aus dem Pilz *Penicillium griseofulvum* (*P. griseofulvum*) isoliert werden und findet seine Anwendung als Antimykotikum bei Dermatophyten (Frisvad *et al.*, 2004; Oxford *et al.*, 1939).

1.3.2 *P. chrysogenum*

Der filamentöse Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*) ist hauptsächlich im Staub oder in der Raumluft von Innenräumen (in Form von Sporen) und auf verschiedenen Lebensmitteln vorzufinden (Chang *et al.*, 1995; Hunter & Lea 1995). Aufgrund seiner exzellenter Fermentationskapazität und der Produktion von β -Lactam-Antibiotika, wird der Pilz schon seit mehr als 80 Jahren untersucht (Fleming 1929; Weber *et al.*, 2012). Lange Zeit wurde angenommen, dass Alexander Fleming aus diesem Schimmelpilz (damals noch als *Penicillium notatum* bezeichnet) das erste medizinisch verwertbare Antibiotikum Penicillin isoliert und nach ihm benannt hat. Jedoch lassen neuere Untersuchungen darauf schließen, dass es sich hierbei vermutlich um einen anderen Vertreter der *Penicillium*-Gattung handelte, *Penicillium rubens* (*P. rubens*) (Houbraken *et al.*, 2011). *P. chrysogenum* stellt einen wichtigen Produzent von diversen Sekundärmetaboliten (Abb.1-1) wie Chrysogeninin, Fungisporin, Meleagrin, Negapillin, Notatin und Xanthocillin dar (Frisvad *et al.*, 2004; Houbraken *et al.*, 2011). Außerdem ist er für die Biosynthese von Patulin, PR-Toxin, Secalonsäure D und F sowie Roquefortin C und D bekannt (Abb.1-1) (Frisvad *et al.*, 2004; Houbraken *et al.*, 2011). Der Pilz wird besonders als Pflanzen-Pathogen beschrieben (Barkai-Golan & Paster 2008), konnte aber mit einer invasiven intestinalen Erkrankung (Barcus *et al.*, 2005) und der pulmonalen Mykose in Verbindung gebracht werden (Geltner *et al.*, 2013). Das Genom mit einer Größe von 32,19 Mb wurde 2008 vollständig sequenziert und annotiert (van den Berg *et al.*, 2008). Auf insgesamt 4 Chromosomen sind 13,911 putative Gene (Xu *et al.*, 2005) unter Anderem codierend für 11 nichtribosomale Peptidsynthetasen verteilt (Ali *et al.*, 2013).

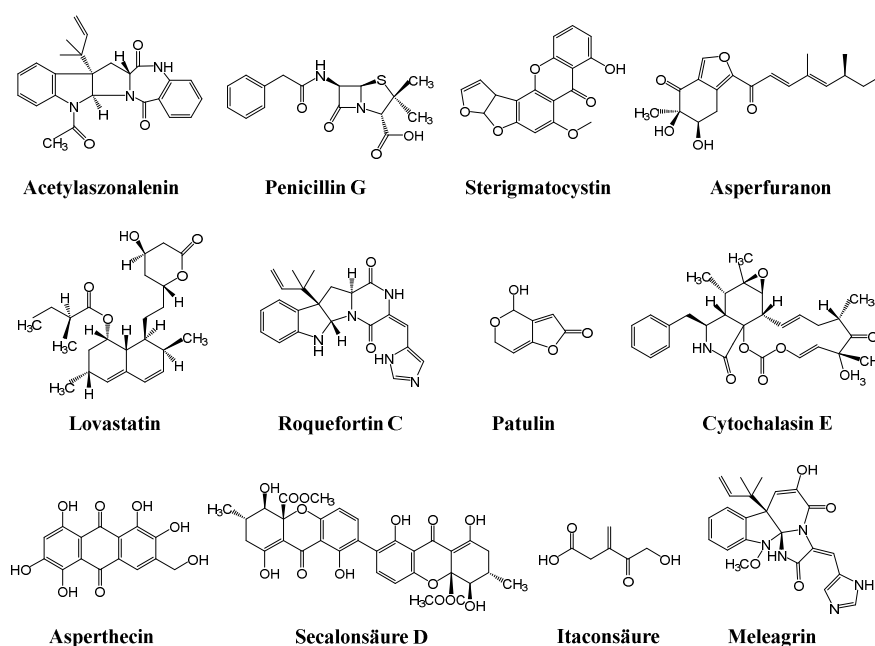


Abb.1-1: Ausgewählte Sekundärmetabolite und Mykotoxine einiger *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten.

1.4 Indolalkaloide

1.4.1 Allgemeines

Die Gruppe der Alkaloide umfasst stickstoffhaltige Substanzen des Sekundärstoffwechsels, deren Ursprung bakteriell, pflanzlich oder pilzlich ist. Die Substanzen reagieren in wässriger Lösung meist alkalisch und der Stickstoff ist in der Regel Teil des Ringsystems. Alkaloide zeichnen sich zudem durch ihre Eigenschaft aus, dass sie direkte, charakteristische Auswirkungen bei den Menschen oder Tieren hervorrufen können. Zur Einteilung der jeweiligen Alkaloidtypen ist der Aufbau des Stickstoff-Heterozyklus Grundgerüsts entscheidend. Die nachstehenden Indolalkaloide zeichnen sich durch das Vorhandensein eines Indol-Grundgerüsts aus und werden oft von der Aminosäure L-Tryptophan abgeleitet.

1.4.2 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen

Prenylierte Indolalkaloide repräsentieren eine Gruppe von hybriden Naturstoffen mit diversen chemischen Strukturen, die sowohl einen Indol- als auch einen Terpen-Molekülbestandteil besitzen. Prenylierte Indolalkaloide kommen in der Natur ubiquitär vor und werden insbesondere von den Vertretern der Familie der Clavicipitaceae und Trichocomaceae aus der Ordnung Ascomycota produziert (Li 2010; Ruiz-Sanchis *et al.*, 2011). Im Vergleich zu den unprenylierten Vorstufen, zeichnen sich diese Sekundärmetabolite durch ihre enormen pharmakologischen und biologischen Aktivitäten als Arzneistoffe oder Toxine aus (Botta *et al.*, 2005; Wallwey & Li 2011).

Die Aminosäure L-Tryptophan stellt dabei die Grundlage vieler prenylierter Indolalkaloide dar und wird durch den Primärstoffwechsel zur Verfügung gestellt (Toyota & Ihara 1998; Williams *et al.*, 2000). Die vielfältigen Strukturen der Indolalkaloide entstehen meist durch die NRPS-katalysierende Verknüpfung von L-Tryptophan mit einer weiteren Aminosäure oder mit einem zweiten L-Tryptophan-Molekül, wodurch ein zyklisches Dipeptid mit einer Diketopiperazinstruktur oder ein Derivat davon gebildet wird. So konnten zum Beispiel bereits die Fellutanine A bis D aus der Gattung *Penicillium* isoliert werden, deren Struktur auf zwei L-Tryptophan-Molekülen basiert (Kozlovskii *et al.*, 2000). Die Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin bilden die Grundlage für eine Vielzahl an zyklischen Dipeptiden und Derivaten aus Pilzen, wie z.B. Stephacidine, Notamide, Austamide, Paraherquamide und Brevianamide (Stocking *et al.*, 2000). Dabei basieren unter Anderem Verruculogen, sowie die Fumitremorgine A, B und C auf der Struktur von Brevianamid F (Ding *et al.*, 2010; Li 2010; Li 2011; Wang *et al.*, 2007a; Williams *et al.*, 2000). Hingegen dazu, bildet L-Tryptophan und

L-Alanin die Ausgangsstoffe für Echinulin und Neoechinulin (Birch & Farrar 1963; Marchelli *et al.*, 1975). Die Aminosäuren L-Tryptophan und L-Histidin stellen die Vorstufen für Roquefortin, Meleagrin, Oxalin und der Glandicoline dar (Reshetilova *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2000). L-Tryptophan und L-Phenylalanin sind wahrscheinlich am Aufbau von Rugulofortin beteiligt (Zelenkova *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Prenylierung von L-Tryptophan zum Aufbau komplexerer Ringstrukturen, wie zum Beispiel bei den Ergotalkaloiden oder der Cyclopiazonsäure (Williams *et al.*, 2000). Da in dieser Arbeit unter anderem C2- und C3-prenylierte Indolalkaloiden analysiert worden sind, werden diese kurz näher beleuchtet.

1.4.2.1 C2-prenylierte Indolalkaloide

Indolalkaloide dieser Gruppe zeichnen sich hauptsächlich durch das Vorhandensein einer Prenyl-Einheit an Position C2 des Indolringes aus (Abb.1-2). In den letzten Jahrzehnten konnte eine Vielzahl an C2-prenylierten zyklischen Dipeptiden aus den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* isoliert und identifiziert werden (Li 2010). Einige weisen sogar antibakterielle und antitumoröse Eigenschaften aus und finden deshalb oft in der Medizin ihre Anwendung. Ein Beispiel dafür sind die Echinuline mit antimikrobieller und antituberkulöser Wirkung, welche von diversen *Aspergillus* Stämmen sowie *Eurotium sp.* und anderen Mikroorganismen produziert werden (Jansen 2012; Kanokmedhakul *et al.*, 2002; Stipanovic & Schroeder 1976; Wang *et al.*, 2007a). Die antitumorös wirkenden Substanzen Tryprostatin A, Tryprostatin B und 6-Hydroxytryprostatin B (Abb.1-4) weisen ebenfalls die charakteristische C2-Prenylierung auf und konnten unter anderem aus marinen *Aspergillus*-Arten isoliert werden (Jain *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012b). Aus *Penicillium fellutanum* (*P. fellutanum*) konnten die C2-revers prenylierten Fellutanine A bis D isoliert werden, deren biosynthetische Vorstufe cyclo-L-Trp-L-Trp darstellt (Kozlovsky *et al.*, 2000; Kozlovsky *et al.*, 2001a). Weitere Beispiele sind Variecolortid B aus *Aspergillus variegatus* (*A. variegatus*) und Terrequinon A aus *A. nidulans*, wobei Letzteres eine Vielzahl an pharmazeutisch relevanten Aktivitäten wie antitumoröse, antiretrovirale und antidiabetische Eigenschaften aufweist (Schneider *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007b).

Zusätzlich zu den C2-prenylierten zyklischen Dipeptiden, zeigt zum Beispiel das aus *A. fumigatus* isolierte Ergotalkaloid (8S, 9S)-Fumigaclavin C eine Prenyleinheit an Position C-2 des Indolringes auf (Ge *et al.*, 2009).

1.4.2.2 C3-prenylierte Indolalkaloide

Die Gruppe der C3-prenylierten Indolalkaloide zeichnet sich durch ihre multizyklische Ringstruktur mit einer vorwiegend revers vorkommenden C-3 Prenylierung am Indolinring aus (Abb.1-2). Hierzu zählt zum Beispiel Fructigenin A aus *P. fructigenum*, ein Derivat des zyklischen Dipeptides cyclo-L-Trp-L-Phe welches das Pflanzenwachstum hemmen kann (Arai *et al.*, 1989). Außerdem wurde Roquefortin C, dessen Vorstufen die Aminosäuren L-Tryptophan und L-Histidin sind, in *P. paneum*, *P. roqueforti* und *P. chrysogenum* identifiziert (Ali *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2006; Ohmomo *et al.*, 1977). Das Mykotoxin Acetylaszonalenin und die nicht-acetylierte Form Aszonalenin konnten in verschiedenen *Neosartorya* und *Aspergillus* Spezies identifiziert werden (Ellestad *et al.*, 1973; Wakana *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009b). Ergänzend dazu, konnte auch die zytotoxische Substanz 5-N-Acetylardeemin in *N. fischeri* sowie in *A. terreus* entdeckt werden (Hochlowski *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2010). Hingegen dazu konnten Substanzen wie Nocardioazin B und Flustramin L, die durch eine reguläre C3-Prenylierung charakterisiert sind, in dem Bakterium *Nocardioopsis sp.* und dem Blätter-Moostierchen *Flustra foliaceae* gefunden werden. Studien konnten dabei die antitumoröse bzw. antimikrobielle Wirkung der Substanzen nachweisen (Raju *et al.*, 2011; Rochfort *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012a).

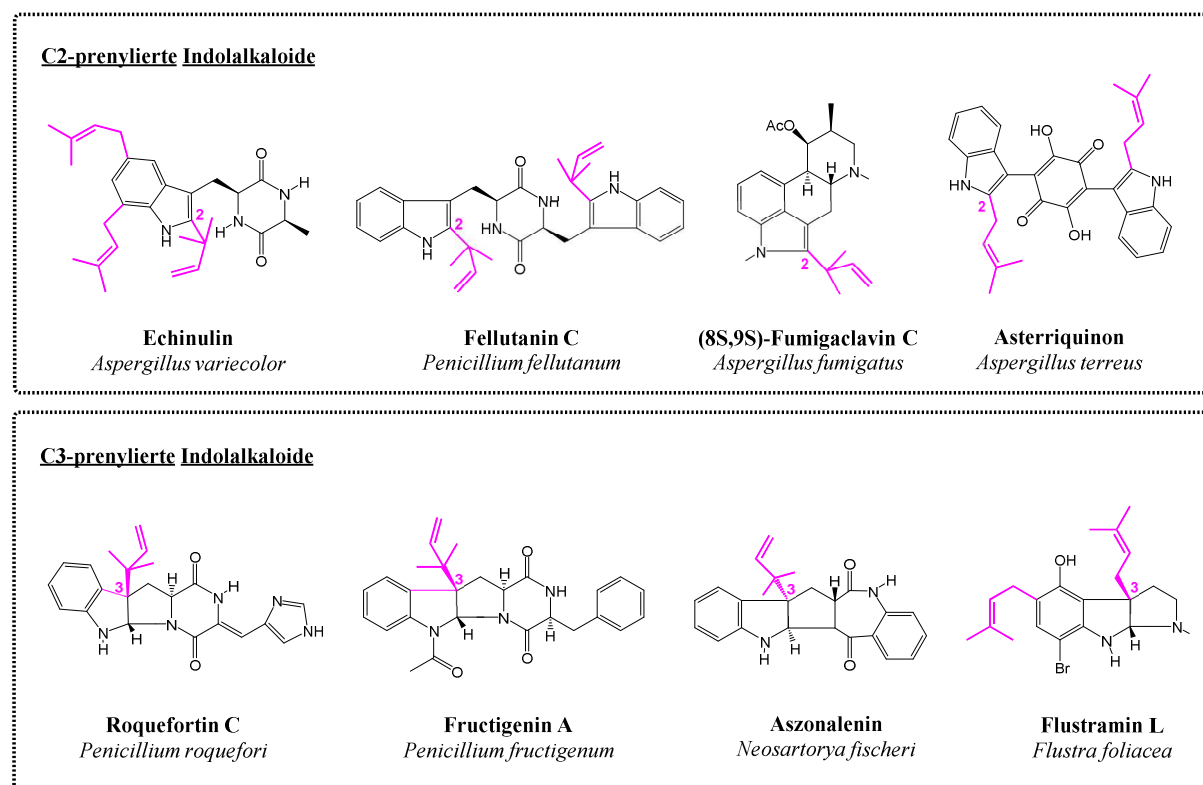


Abb.1-2: Beispiele einiger vorkommender C2- und C3-prenylierter Indolalkaloide. Modifiziert nach (Yu 2013).

1.4.3 Fumitremorgin-Typ Indolalkaloide

Verruculogen und Fumitremorgin A (Abb.1-4) zählen strukturell gesehen zu den Fumitremorgin-Typ Indolalkaloiden, deren zyklisches Grundgerüst aus den Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin, auch bekannt als Brevianamid F, aufgebaut ist (Williams *et al.*, 2000). Zu dieser Gruppe gehören mehr als 20 Mitglieder, wie Tryprostatine, Cyclotryprostatine und Spirotryprostatine (Frisvad *et al.*, 2009). Die Mykotoxine verursachen durch ihren spezifischen Effekt auf das zentrale Nervensystem einen Tremor und Krämpfe bei Mäusen und wurden als M-Phase Inhibitoren innerhalb der Zellteilung nachgewiesen (Borthwick 2012; Frisvad *et al.*, 2009). Aus diesem Grund sind einige Fumitremorgin-Typ Indolalkaloide interessante Kandidaten zur Herstellung von Zytostatika. In diesem Zusammenhang wurde bereits Tryprostatin A und Fumitremorgin C als Inhibitoren des BCRP (breast cancer resistance protein), ein ABC-Transporter, welcher Blutzellen eine Multiresistenz gegenüber Zytostatika verleihen kann (Jain *et al.*, 2008; Rabindran *et al.*, 2000), sowie Verruculogen und Fumitremorgin B als genotoxisch bestätigt werden (Sabater-Vilar *et al.*, 2003).

In den letzten Jahrzehnten konnte Verruculogen aus diversen Pilzstämmen isoliert werden. Hierzu zählen *A. fumigatus* (Afiyatulloev *et al.*, 2005), *A. clavatus* (Sabater-Vilar *et al.*, 2004), *Aspergillus caespitosus* (*A. caespitosus*) (Schroeder *et al.*, 1975), *Aspergillus egyptiacus* (*A. egyptiacus*) (Samson *et al.*, 2011), *N. fischeri* (Nielsen *et al.*, 1988), sowie aus der Gattung *Penicillium* (Gallagher & Latch 1977) und dessen Teleomorph *Eupenicillium* (Wang *et al.*, 1995). Einige der erwähnten Pilzstämmen sind dabei auch in der Lage das Mykotoxin Fumitremorgin A zu produzieren, z.B. *A. caespitosus* (Bräse *et al.*, 2009), *A. egyptiacus* (Samson *et al.*, 2011), *A. fumigatus* (Yamazaki *et al.*, 1980), *N. fischeri* (Nielsen *et al.*, 1988) und *Penicillium brasilianum* (*P. brasilianum*) (Fill *et al.*, 2012), der einzige Vertreter der Gattung *Penicillium*. Die Struktur von Verruculogen leitet sich von der Vorstufe Fumitremorgin B ab und ist durch das Vorhandensein einer Endoperoxid-Brücke zwischen den zwei Prenyl-Einheiten gekennzeichnet. Im Vergleich dazu ist Fumitremorgin A durch eine zusätzliche Prenylierung an OH-13 charakterisiert (Abb.1-4).

Der Vergleich der Genomsequenzen von *A. fumigatus* Af293, A1163 und des nahen Verwandten *N. fischeri* NRRL181, führte zur Identifizierung eines Genclusters, welches für die Biosynthese von Fumitremorginen verantwortlich ist (Abb.1-3). Das Fumitremorgin-Gencluster ist auf dem 8. Chromosom in *A. fumigatus* Af293 lokalisiert und umfasst eine Größe von 25 kb (747,862 bp – 772,825 bp; in GenBank unter der Accession Nr.: AAHF01000014) (Li 2011). Dabei wiesen die einzelnen Gene der Pilzstämmen hohe Sequenzidentitäten von 68 % bis 100 % auf Aminosäureebene zueinander auf.

1 kb

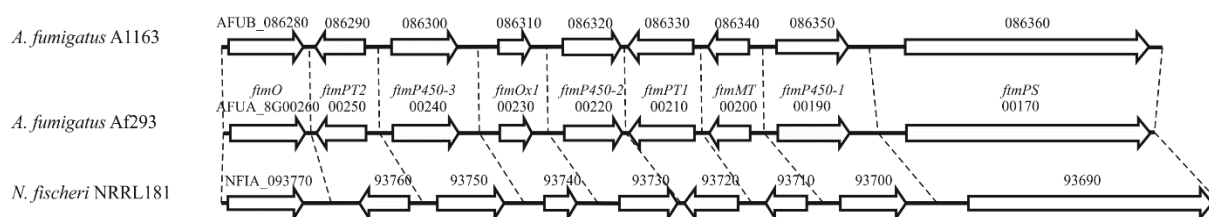


Abb.1-3: Putatives Fumitremorgin-Gencluster von *A. fumigatus* A1163, Af293 und *N. fischeri* NRRL181.

Lange wurde angenommen das Fumitremorgin-Gencluster aus insgesamt 10 Genen besteht, jedoch zeigt ein Vergleich der Cluster untereinander, dass *fmO* und *fmP* aus *N. fischeri* wahrscheinlich nicht dazu gehören (Kato *et al.*, 2009). Durch biochemische Analysen der einzelnen *fm*-Gene von *A. fumigatus* Af293 oder deren Orthologe konnten die einzelnen Funktionen innerhalb des Biosyntheseweges nachgewiesen werden. Im ersten Schritt findet die Kondensation der Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin zu Brevianamid F, katalysiert durch die nichtribosomale Peptidsynthetase FtmPS statt (Abb.1-4) (Maiya *et al.*, 2006). Brevianamid F wird anschließend durch die C2-Prenyltransferase FtmPT1 zu Tryprostatin B umgesetzt (Grundmann & Li 2005).

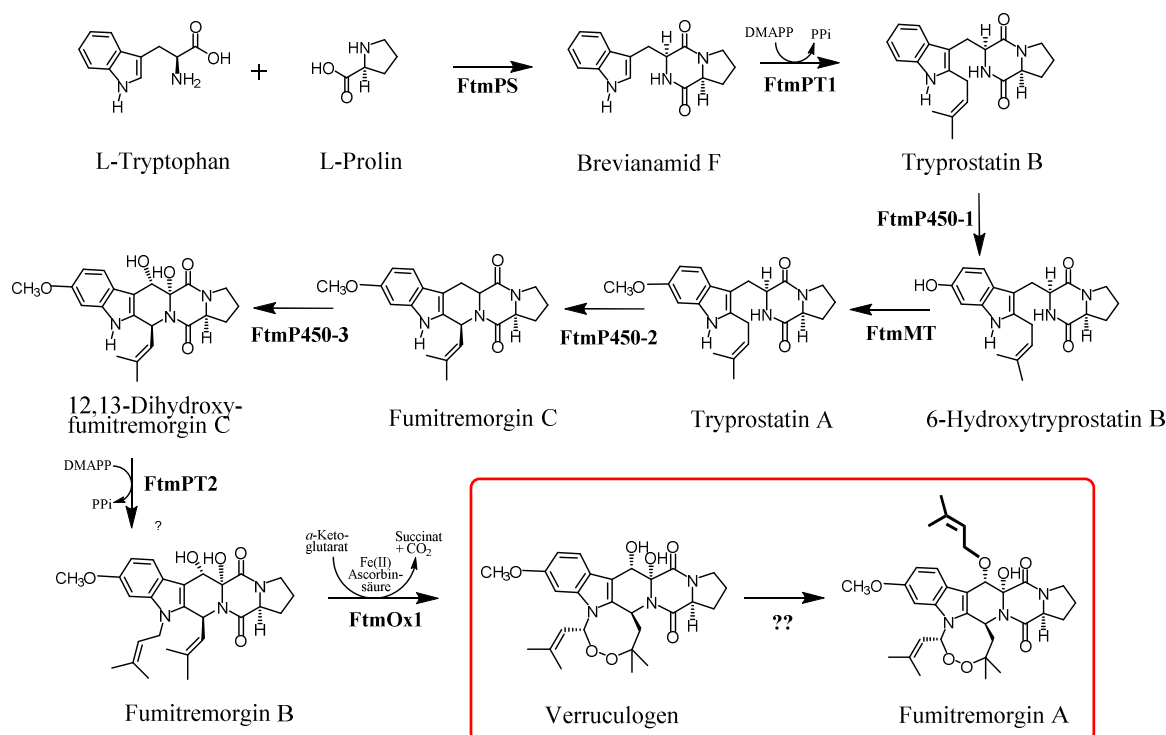


Abb.1-4: Putativer Biosyntheseweg von Verruculogen bzw. Fumitremorgin A in *N. fischeri* NRRL181 (modifiziert nach (Li 2011)). Abkürzungen: DMAPP, Dimethylallyldiphosphat; PPi, Pyrophosphat.

Durch Geninaktivierung und heterologer Expression konnten Kato *et al.* zeigen, dass die drei Cytochrom P450-Gene *fmP450-1*, *fmP450-2* und *fmP450-3* die Reaktionen von Tryprostatin

B zu 6-Hydroxyfomitremorgin B, Tryprostatin A zu Fomitremorgin C bzw. Fomitremorgin C zu 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C katalysieren (Kato *et al.*, 2009). Außerdem konnte Tsunematsu *et al.* die Beteiligung von FtmP450-3 in der Bildung von Spirotrypostatin B und G nachweisen (Tsunematsu *et al.*, 2013). Bislang konnte nur noch nicht die Funktion der putativen Methyltransferase FtmMT experimentell bewiesen werden. Jedoch wird die Methylierung von 6-Hydroxytryprostatin B zu Tryprostatin A spekuliert. Die Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C wird durch die *N*-Prenyltransferase FtmPT2 katalysiert. Das entstandene Produkt Fomitremorgin B wird anschließend durch FtmOx1 unter der Zugabe von α -Ketoglutarat, Ascorbinsäure, Fe(II) und molekularem Sauerstoff unter Einbau einer Endoperoxid-Brücke zu Verruculogen umgesetzt (Steffan *et al.*, 2009). Wie schon eingangs erwähnt, konnten Verruculogen und Fomitremorgin A bereits aus *A. fumigatus* und *N. fischeri* isoliert werden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde jedoch aufgrund der fehlenden *O*-Prenyltransferase, welche die Prenylierung von Verruculogen zu Fomitremorgin A katalysiert, Verruculogen als Endprodukt des Fomitremorgin-Biosyntheseweges postuliert. Das codierende Gen für die Prenyltransferase war zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert worden.

1.5 Prenyltransferasen

Prenyltransferasen sind wichtige Enzyme innerhalb des Primär- und Sekundärstoffwechsels von Bakterien, Pflanzen und Pilzen. Prenyltransferasen katalysieren die Verknüpfung von Isopreneinheiten miteinander oder mit Aromaten, sowie mit anderen Molekülen und tragen deshalb entscheidend zur strukturellen und biologischen Diversität von Naturstoffen bei. Für die Übertragung des Isoprenrestes auf das entsprechende Substrat, werden je nach Enzym verschiedene Donatoren wie Dimethylallyldiphosphat (C-5), Geranyldiphosphat (C-10) oder Farnesyldiphosphat (C-15) verwendet (Stec *et al.*, 2011; Yazaki *et al.*, 2002). Anhand der Verbindung der Prenyleinheit mit dem entsprechenden Substrat, können die Substanzen in 2 Typen eingeteilt werden, d.h. „reguläre“ und „reverse“ prenylierte Derivate. Die Prenyleinheit kann dabei mit dem Aromat regulär über das C-1-Atom verbunden sein oder revers über das C-3-Atom (Abb.1-5).

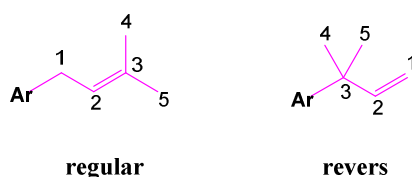


Abb.1-5: Reguläre und reverse Prenyleinheiten. Abkürzungen: Ar, Aromat.

1.5.1 Aromatische Prenyltransferasen

Aromatische Prenyltransferasen sind für den Transfer allylischer Isopreneinheiten auf ein aromatisches Akzeptormolekül verantwortlich. Sie stellen die Schlüsselenzyme in der Biosynthese vieler Primärmetabolite dar und tragen ebenfalls zu einer großen Sekundärstoffvielfalt bei. Basierend auf der großen Anzahl an Sequenz-Veröffentlichungen aus verschiedenen Genomprojekten, konnten in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte in den molekularbiologischen, biochemischen und strukturellen Analysen aromatischer Prenyltransferasen gemacht werden. Anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und Aminosäuresequenzen lassen sie sich in mindestens vier nachfolgend beschriebene Gruppen einteilen.

1.5.1.1 Prenyltransferasen der UbiA-Superfamilie

Membrangebundene Prenyltransferasen kommen in Bakterien, Pilzen sowie Pflanzen vor und sind oft im Primärmetabolismus (Ubichinon und Menachinon) involviert. Enzyme dieser Gruppe akzeptieren diverse aromatische Substanzen, wobei ihre Reaktion von der Anwesenheit von Mg^{2+} oder ähnlichen divalenten Kofaktoren strikt abhängig ist (Ohara *et al.*, 2006). Prenyltransferasen der UbiA-Superfamilie weisen ein oder mehrere hoch konservierte (N/D)DXXD-Motive auf, die für die Bindung des Prenyldiphosphates essentiell sind. Bereits gut charakterisierte Mitglieder dieser Gruppe sind die zuerst entdeckten aromatischen Prenyltransferasen UbiA aus *Escherichia coli* (*E. coli*) und COQ2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), welche eine zentrale Rolle in der Ubichinon- und Menachinon-Biosynthese spielen (Ashby *et al.*, 1992; Melzer & Heide 1994; Nakagawa *et al.*, 2010). In den letzten Jahren konnten weitere Mitglieder der UbiA-Superfamilie identifiziert werden, welche an der Biosynthese verschiedener Sekundärmetabolite beteiligt sind. Hierzu zählen zum Beispiel SfN8DT (Sasaki *et al.*, 2008), SFG6DT sowie SfILD1 (Sasaki *et al.*, 2011), welche für die Flavonoid-Biosynthese in *Sophora flavescens* (*S. flavescens*) essentiell sind und LePGT1 aus *Lithospermum erythrorhizon* (*L. erythrorhizon*), das bei der Shikonin-Biosynthese eine wichtige Rolle spielt (Yazaki *et al.*, 2002). AuaA ist an der Aurachin D-Biosynthese in *Stigmatella aurantiaca* (*S. aurantiaca*) beteiligt (Stec *et al.*, 2011).

1.5.1.2 Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe

Prenyltransferasen dieser Gruppe sind lösliche Enzyme und katalysieren die Prenylierung diverser Substanzen, wie z.B. Naphtalin- oder Chinon-Derivate aus Bakterien und Pilzen

(Heide 2009). CloQ aus *Streptomyces roseochromogenes* (*S. roseochromogenes*), das erste Mitglied dieser Familie, und sein Ortholog NovQ aus *Streptomyces niveus* (*S. niveus*), sind in der Lage 4-Hydroxybenzoesäure zu prenylieren (Ozaki *et al.*, 2009; Pojer *et al.*, 2003). NphB von *Streptomyces sp.* und das Homolog SCO7190 aus *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*) katalysieren die Prenylierung von 1,6-Dihydroxynaphthalin in Gegenwart von sowohl GPP als auch DMAPP (Kumano *et al.*, 2008; Kuzuyama *et al.*, 2005). Vertreter dieser Gruppe zeigen keine Sequenzähnlichkeiten zu den membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen auf. Ihre Aktivität ist, mit Ausnahme von NphB, unabhängig von divalenten Metallionen (Tello *et al.*, 2008). Außerdem sind Mitglieder der CloQ/NphB-Gruppe durch das Fehlen eines DDxxD-Motifs gekennzeichnet. Durch Strukturanalysen von CloQ und NphB konnte gezeigt werden, dass beide Enzyme eine gemeinsame Architektur besitzen, die aus α - β - β - α -Elementen aufgebaut ist und als „Prenyltransferase-barrel“ bzw. „PT-barrel“ bezeichnet wird (Kuzuyama *et al.*, 2005; Metzger *et al.*, 2010). Aufgrund ihrer vorhandenen „PT-barrel“ Faltung zählen sie zu der Superfamilie der sogenannten ABBA-Prenyltransferasen.

1.5.1.3 Prenyltransferasen der LtxC-Gruppe

Prenyltransferasen der LtxC-Gruppe sind lösliche Proteine und sind hauptsächlich in Bakterien anzutreffen. Obwohl sie nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu den Mitgliedern der DMATS-Superfamilie aufzeigen, sind sie in der Lage Indolderivate als Substrate zu verwenden. LtxC aus *Lyngbya majuscula* (*L. majuscula*) ist das erste bekannte Mitglied dieser Gruppe und katalysiert unter Anwesenheit von GPP die Reaktion von (-)-Indolactam V zu Lyngbyatoxin (Edwards & Gerwick 2004). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind CymD von *Salinispora arenicola* (*S. arenicola*), SCO7467 von *S.coelicolor* und IptA von *Streptomyces sp.* SN-593 welche für die Prenylierung von L-Tryptophan an Position N-1, C-5 und C-6 verantwortlich sind (Ozaki *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2010; Subramanian *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010).

1.5.1.4 Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie

In den letzten Jahren konnten zahlreiche lösliche Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie identifiziert werden, welche vorwiegend die Prenylierung von Indolderivaten katalysieren (Yu & Li 2012). Diese Enzyme weisen ebenfalls kein (N/D)DxxD-Motiv auf und ihre Aktivität ist unabhängig von divalenten Metallionen. Aufgrund der eindeutigen Sequenzidentität zu der 4-Dimethylallyltryptophansynthase (4-DMATS) aus *Claviceps purpurea* (*C. purpurea*), welche den ersten Schritt in der Ergotalkaloid-Biosynthese katalysiert (Tsai *et al.*, 1995; Unsöld & Li

2005), wird diese Enzymgruppe als „DMATS-Superfamilie“ bezeichnet. Mit der Verfügbarkeit der Genomsequenz von *A. fumigatus* im Jahr 2004 (Unsöld & Li 2005) begann die biochemische Charakterisierung einer Vielzahl von verschiedenen Indolprenyltransferasen. Die Untersuchungen konnten eine breite Substratspezifität und zudem eine regiospezifische Prenylierung der Prenyltransferasen nachweisen. Mittlerweile konnten Prenyltransferasen für die Prenylierung an allen Positionen des Indols (N-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7) identifiziert und charakterisiert werden (Abb.1-6). Mit der Charakterisierung der Prenyltransferase 5-DMATS aus *A. clavatus*, welche die Prenylierung von unter anderem L-Tryptophan an Position C-5 des Indolringes katalysiert, konnte dabei die letzte Lücke innerhalb der Indol-Prenylierungspositionen geschlossen werden (Yu *et al.*, 2012). Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel FtmPT1 und FtmPT2 aus *A. fumigatus*, welche in der Fumitremorgin-Biosynthese mitwirken (Grundmann *et al.*, 2008; Grundmann & Li 2005).

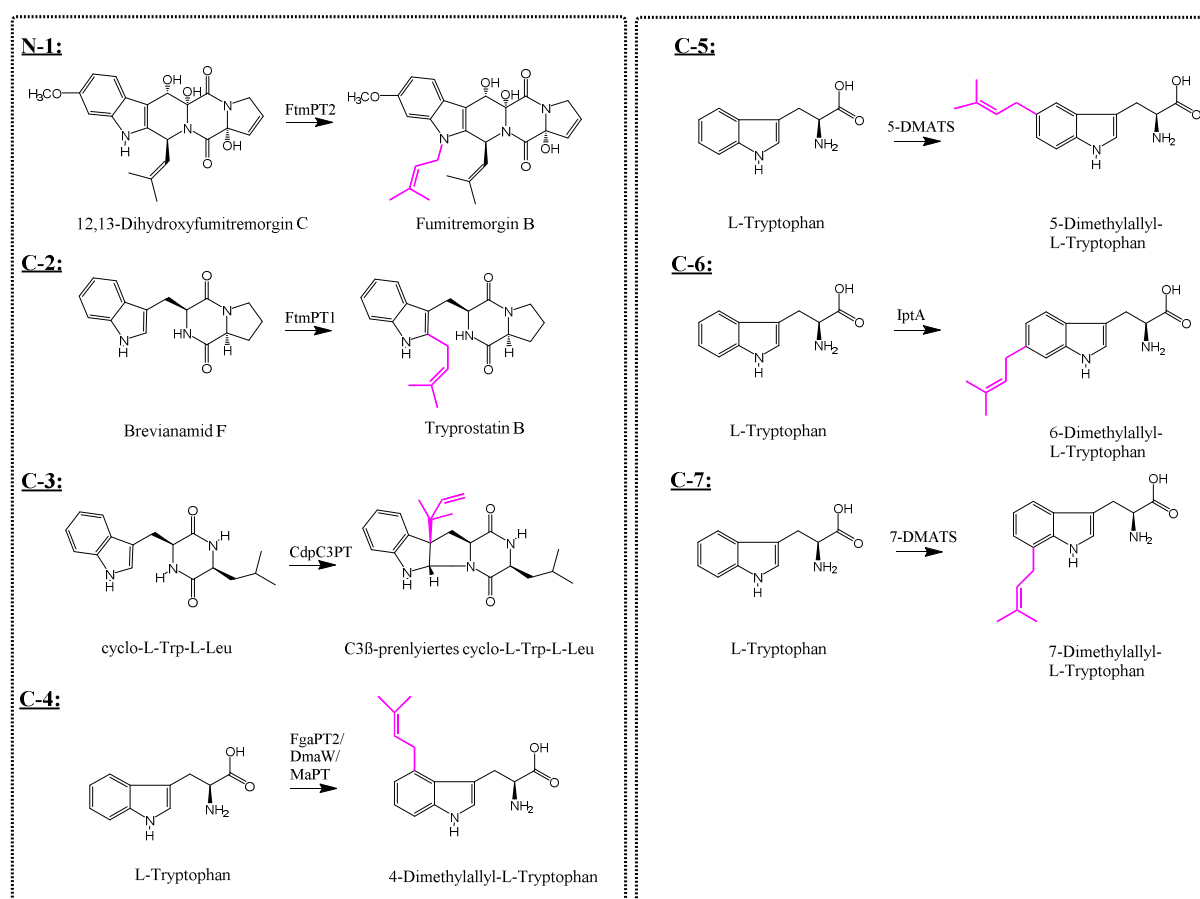


Abb.1-6: Ausgewählte Beispiele für die regioselektive Prenylierung verschiedener Substrate katalysiert durch verschiedene Prenyltransferasen in Anwesenheit von DMAPP. Der übertragene Prenylrest ist farblich markiert; modifiziert nach (Yu *et al.*, 2012).

Die N1-Prenyltransferase CTrpPT aus *A. oryzae*, welche cyclo-L-Trp-L-Trp als bestes Substrat akzeptiert (Zou *et al.*, 2010). Weitere Vertreter sind unter anderem FgaPT1 (Unsöld & Li 2006),

FgaPT2 (Unsöld & Li 2005), CdpNPT (Yin *et al.*, 2007), 7-DMATS (Kremer *et al.*, 2007), AnaPT (Yin *et al.*, 2009b) und CdpC3PT (Yin *et al.*, 2010) aus *A. fumigatus* und *N. fischeri*. Neben den Indol-Prenyltransferasen gehören auch Vertreter zu dieser Gruppe, welche andere Substanzen prenylieren können. Hierzu zählen die *O*-Prenyltransferasen XptB aus *A. nidulans*, SirD aus *Leptosphaeria maculans* (*L. maculans*) und PAPT von *Phomopsis amygdali* (*P. amygdali*), welche als natürliche Substrate 1,7-Dihydroxy-6-Methyl-8-Hydroxymethyl-Xanthon bzw. L-Tyrosin und Fussicoccin P akzeptieren (Kremer & Li 2010; Noike *et al.*, 2012; Pockrandt *et al.*, 2012). VrtC von *Penicillium aethiopicum* (*P. aethiopicum*) katalysiert die Prenylierung von tetrazyklischen Naphthacenedionen (Chooi *et al.*, 2012) und das Homolog NscD aus *N. fischeri* ist in der Lage trizyklische Naphthacenedione umzusetzen (Chooi *et al.*, 2013). Überraschenderweise zeigten Strukturanalysen, dass FgaPT2, FtmPT1 und CdpNPT ebenfalls einen „PT-barrel“ besitzen (Jost *et al.*, 2010; Metzger *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2012), welcher bisher nur in aromatischen Prenyltransferasen von Bakterien der CloQ/NphB Gruppe nachgewiesen werden konnte. Diese Entdeckung lässt vermuten, dass beide Gruppen eine gemeinsame Abstammung haben (Bonitz *et al.*, 2011).

Lösliche aromatische, als auch membrangebundene Prenyltransferasen konnten bereits aufgrund ihrer breiten Substratspezifität, erfolgreich bei der chemoenzymatischen Synthese neuer prenylierter Aromaten eingesetzt werden (Li 2010; Ozaki *et al.*, 2009; Yu & Li 2012).

1.6 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) sind in der Lage Naturstoffe zu synthetisieren, welche für die Pharmaindustrie von essentieller Bedeutung sein können. Die entstandenen Peptide, welche vorwiegend in Bakterien oder Pilzen vorzufinden sind, zeigen dabei eine enorme Bandbreite an diversen Aktivitäten auf. So können sie unter anderem als Immunsuppressiva, Zytostatika oder Antibiotika eingesetzt werden. Einige ausgewählte Strukturen gebildet durch nichtribosomalen Peptidsynthetasen sind in Abb.1-7 dargestellt.

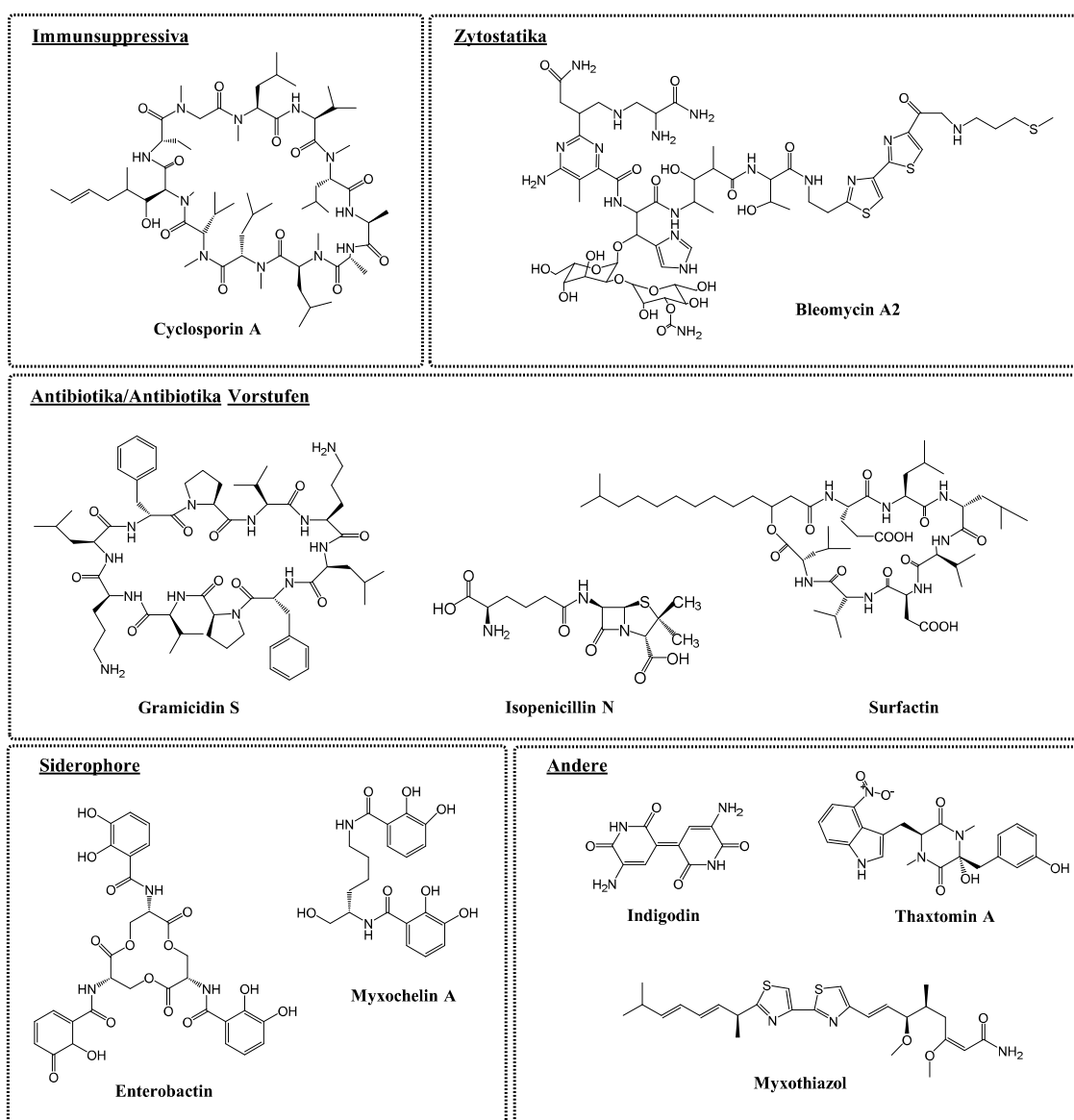


Abb.1-7: Beispiele von biologisch aktiven Substanzen gebildet durch NRPS. Die Substanzen wurden aufgrund ihrer biologischen Aktivität in 5 verschiedene Gruppen unterteilt. Modifiziert nach (Schwarzer *et al.*, 2003).

Das Isopenicillin N zum Beispiel stellt die biosynthetische Vorstufe für die Antibiotika aus der Penicillin- und Cephalosporin-Familie dar. Andere Substanzen mit antibiotischer Aktivität sind

Tyrocidin A (Mootz & Marahiel 1997), Gramicidin S (Hori *et al.*, 1989; Turgay *et al.*, 1992) und Vancomycin (van Wageningen *et al.*, 1998). Das Immunsuppressivum Cyclosporin A, welches aus *A. terreus* und *T. inflatum* (Bushley *et al.*, 2013; Sallam *et al.*, 2003) isoliert werden konnte, wird hauptsächlich bei der Nachbehandlung von Organ-Transplantations Patienten verwendet. Bleomycin A2 ist ein Zytostatikum und findet innerhalb der Krebstherapie seine Anwendung. Die Siderophore Enterobactin und Myxochelin A von *E. coli* und *S. aurantiaca*, werden unter Eisen-limitierenden Bedingungen in das umgebende Milieu abgegeben und nach Komplexierung wieder in die Zelle aufgenommen, um somit die Eisen-Versorgung des entsprechenden Stammes zu gewährleisten (Crosa 1989; Crosa & Walsh 2002). Weiterhin sind in der Abb.1-7 die Strukturen von Toxinen wie Thaxtomin A (Healy *et al.*, 2000), Pigmente wie Indogodin (Reverchon *et al.*, 2002) und Myxothiazol, einen Inhibitor der Atmungskette (Starkov & Fiskum G. 2001), zu erkennen.

Nichtribosomale Peptidsynthetasen sind Multienzymkomplexe, die aus verschiedenen Modulen aufgebaut sind und eine beachtliche Größe aufweisen. Cyclosporin A beispielsweise wird von einer einzigen NRPS mit einer Größe von 1,6 MDa synthetisiert (Weber *et al.*, 1994). Die Peptid-Synthese wird in Pilzen vorwiegend durch ein einziges Enzym katalysiert, dagegen werden in Bakterien meist mehrere NRPS-Enzyme benötigt (Hoffmeister & Keller 2007; Schwarzer *et al.*, 2003).

Die verschiedenen Module der NRPS sind für den Einbau spezifischer Aminosäure in das Endprodukt verantwortlich (Marahiel *et al.*, 1997; von Döhren *et al.*, 1997). Jedes Modul kann wiederum in einzelne Domänen unterteilt werden (Abb.1-8), welche die enzymatischen Einheiten darstellen und einzelne Schritte innerhalb der nichtribosomalen Peptidsynthetase katalysieren (Stachelhaus & Marahiel 1995). Diese Domänen können aufgrund ihrer charakteristischen und hoch-konservierten Sequenzmotive, auch bekannt als „*core-motifs*“, auf Aminosäureebene identifiziert werden.

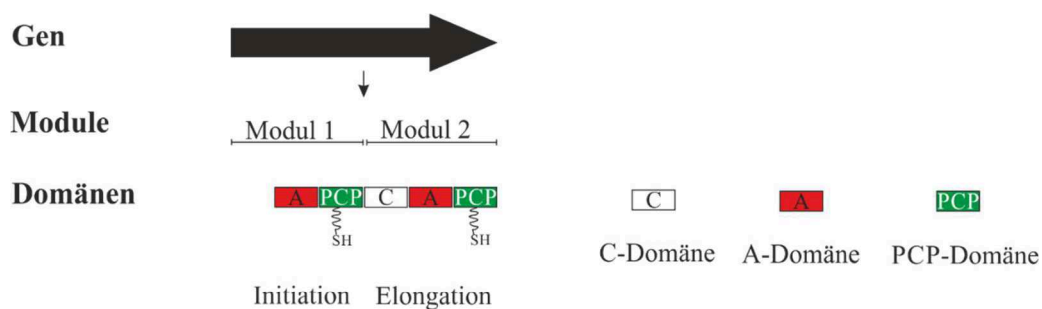


Abb.1-8: Schema eines vereinfachten NRPS-Modelles. Abkürzungen: C-Domäne, Kondensations-Domäne; A-Domäne, Adenylierungs-Domäne; PCP-Domäne, Peptidyl Carrier Protein-Domäne. Modifiziert nach (Strieker *et al.*, 2010).

Ein typisches NRPS-Modul besteht aus insgesamt 3 Domänen für die Adenylierung, Thiolierung und Kondensation. Die Adenylierungs-Domäne (A-Domäne) erkennt und aktiviert eine spezifische Aminosäure unter ATP-Verbrauch und überträgt den Aminoacylrest auf den beweglichen Arm des Peptidyl Carrier Proteins (PCP-Domäne). Die Substratspezifität der A-Domänen ist dabei von insgesamt 10 unterschiedlichen *core-motifs* abhängig, welche als „*codons*“ fungieren (Kalb *et al.*, 2013). Durch gezielte Punkt-Mutationen innerhalb des *core motif* kann die Spezifität der A-Domäne geändert werden (Eppelmann *et al.*, 2002; Stachelhaus *et al.*, 1999). Die PCP-Domäne, früher auch Thiolierungs-Domäne genannt, hat als Thioester die aktivierten Aminoacyl- und Peptidylgruppen an seiner prosthetischen Gruppe 4'-Phosphopanthetin (4'PP-Kofaktor) kovalent gebunden, besitzt jedoch selbst keine katalytische Aktivität (Schracke 2005). Dabei wird der 4'PP-Kofaktor posttranslational von dem Koenzym A auf einen konservierte Serinrest der PCP-Domäne übertragen, wodurch die inaktive Form (*apo*-PCP) in die aktive *holo*-Form (HS-4'PP-PCP) umgewandelt wird. Dieser Schritt wird durch 4'-Phosphopantethein-Transferasen katalysiert (Schwarzer *et al.*, 2003). Die PCP-Domäne überträgt im nächsten Schritt das gebundene Intermediat zu der Kondensations-Domäne (C-Domäne), an der die Kondensation mit der entsprechenden zweiten Aminosäure erfolgt (Stachelhaus *et al.*, 1996). Neben den drei genannten Domänen, können für die strukturelle Umgestaltung jedoch zusätzliche Domänen an der Peptidsynthese beteiligt sein. So können zum Beispiel weitere Domänen für eine Methylierung, Oxidation, Reduktion, Hydroxylierung oder Epimerisierung des Substrates in einem Modul vorhanden sein (Pohlmann & Marahiel 2008). Die zum Schluss stattfindende Freisetzung des Peptides bzw. die Multimerisierung des Produktes wird durch die Terminationsdomäne (TE-Domäne), die unmittelbar auf die letzte PCP-Domäne der NRPS folgt, katalysiert.

NRPS werden je nach Aufbau und Abfolge der Module in lineare (Typ A), iterative (Typ B) und nicht-lineare NRPS (Typ C) eingeteilt. Bei einer linearen NRPS (Typ A) ist die lineare Anzahl und Reihenfolge der Module für die Peptidsequenz entscheidend. Die iterativen NRPS (Typ B) sind ebenfalls durch die lineare Modul-Reihenfolge gekennzeichnet, jedoch nutzen sie ihre Module mehrmals für eine vollständige Peptidsynthese. Ein Beispiel dafür ist die Enterobactin-Synthetase, welche für die Assemblierung 2 Module dreimal wiederholen muss (Schwarzer *et al.*, 2003). Im Vergleich dazu, weisen nicht-linearen NRPS (Typ C) mindestens einen weiteren Baustein auf, dessen biosynthetische Logik bisher noch nicht geklärt werden konnte. Ein bekanntes Beispiel hierfür stellt die Yersiniabactin-Synthetase dar, die sich innerhalb der Modulstruktur durch das Vorhandensein einer Cy-Mt-PCP Einheit auszeichnet (Crosa & Walsh 2002; Gehring *et al.*, 1998).

In Verbindung mit Polyketidsynthasen (PKS) bilden NRPS sogenannte PKS-NRPS Hybridenzyme, welche für die Synthese strukturell vielfältiger Substanzen verantwortlich sind und bereits in der Pseurotin A-Biosynthese in *A. fumigatus* nachgewiesen werden konnten (Maiya *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel ist das Enzym CpaA, welches für die Biosynthese von Cyclopiazonsäure in *Aspergillus. flavus* (*A. flavus*) verantwortlich ist und ApdA, dass die Aspyridon-Synthese in *A. nidulans* katalysiert (Bergmann *et al.*, 2007; Seshime *et al.*, 2009). NRPS bzw. PKS/NRPS Hybridenzyme sind für die Biosynthese von pharmazeutisch relevanter Naturstoffe im Sekundärstoffwechsel von Pilzen von großer Bedeutung. Bisher konnte eine Vielzahl an Naturstoffen aus Pilzen isoliert und identifiziert werden, an deren Biosynthese nicht nur NRPS oder PKS/NRPS Enzyme sondern auch Prenyltransferasen beteiligt sind. Vertreter hierfür sind zum Beispiel die Substanzen Acetylaszonalenin (Yin *et al.*, 2009b), Fumitremorgine (Li 2011), Thiopyrazine und Fumiquinazoline (Gao *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2011). Dabei kann durch die Prenylierung die biologische Aktivität enorm gesteigert werden, wie im Fall von Brevianamid F und dem prenylierten Produkt Tryprostatin B (Jain *et al.*, 2008; Usui *et al.*, 1998). Die gezielte Kombination von ausgewählten NRPS-Genen mit verschiedenen Prenyltransferasen stellt dabei ein wichtiges Werkzeug in der Herstellung neuer Naturstoffe dar und bedarf näherer Untersuchungen.

1.7 Aminooxidasen

Aminooxidasen kommen in der Natur ubiquitär vor und lassen sich generell in zwei Typen unterteilen. Die erste umfasst die Kupfer-enthaltenen Aminooxidasen (AO), welche einen Chinon-Kofaktor besitzen und die zweite Gruppe besteht aus den Flavin-enthaltenen Diaminooxidasen (DAO) oder Polyaminooxidasen (PAO). Im Vergleich zu der ersten Gruppe, die vorwiegend die Oxidation von Monoaminen katalysieren, sind die Flavin-enthaltenen Enzyme für die oxidative Desaminierung von Diaminen bzw. Polyaminen zuständig (Blaschko 1974; Schilling & Lerch 1995). Die Aktivität von Aminooxidasen konnte bereits im Mycel einiger Pilzgattungen wie *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus* und *Fusarium* nachgewiesen werden (Yamada *et al.*, 1965). Einige wichtige pilzliche Aminooxidasen sind MAO-N (Schilling & Lerch 1995) und AO-I von *A. niger* (Kolarikovà *et al.*, 2009), ANAO von *A. nidulans* (McGrath *et al.*, 2011) und GFAO von *Gibberella fujikuroi* (*G. fujikuroi*) (Frèbort *et al.*, 2008). In Pflanzen sind Aminooxidasen durch die Formation von vielen Sekundärmetaboliten wie Nicotin, Tropan und Piperidin-Alkaloiden hauptsächlich in der Schädlingsabwehr involviert (Facchini 2001; Martin-Tanguy 2001).

2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Charakterisierung von FtmPT3 aus dem Fumitremorgin-Gencluster von *N. fischeri*

Das Gen *NFIA_093400* aus dem Pilzstamm *N. fischeri* NRRL181 sollte mit Hilfe des Expressionswirtes *E. coli* exprimiert und das überproduzierte Enzym EAW19377 biochemisch charakterisiert werden.

Folgende Arbeiten waren vorgesehen:

- Amplifikation von *NFIA_093400* aus cDNA von *N. fischeri* zur Kontrolle der vorhergesagten Intron-Exon Struktur
- Amplifikation von *NFIA_093400* aus *N. fischeri* und Klonierung in den Expressionsvektor pHIS8 mit anschließender Expression des Gens in *E. coli* und Aufreinigung des überproduzierten Proteins
- Untersuchungen des Proteins auf eine mögliche Beteiligung in dem Schritt des Biosyntheseweges von Verruculogen zu Fumitremorgin A
- Untersuchungen zur Akzeptanz von Verruculogen-Vorstufen und Identifizierung des natürlichen Substrates
- Isolierung und Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte, sowie Bestimmung der kinetischen Parameter der katalytischen Reaktion

Biochemische Charakterisierung von CdpC2PT aus *N. fischeri*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das putative Prenyltransferasegen *NFIA_043650* aus *N. fischeri* NRRL181 in *E. coli* exprimiert und das überproduzierte Protein EAW25546 biochemisch charakterisiert werden.

Folgende Arbeiten sollten durchgeführt werden:

- Amplifikation von *NFIA_043650* aus cDNA von *N. fischeri* zur Kontrolle der vorhergesagten Intron-Exon Struktur
- Amplifikation von *NFIA_043650* aus *N. fischeri* und Klonierung in den Expressionsvektor pQE60 mit anschließender Expression des Gens in *E. coli* und Aufreinigung des überproduzierten Proteins
- Identifizierung des natürlichen Substrates von EAW25546 mit Hilfe von Enzymassays in Anwesenheit von DMAPP und der Analyse per HPLC
- Biochemische Charakterisierung, darunter Isolierung und Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte, sowie Bestimmung der kinetischen Parameter der katalytischen Reaktion

Untersuchungen zu den putativen Prenyltransferasen NFIA_062330 aus *N. fischeri* und dem Ortholog ACLA_042210 aus *A. clavatus*

Durch ein Vergleich der Aminosäuresequenz des letzten unbekannten putativen Prenyltransferasegens *NFIA_062330* (EAW21072) aus *N. fischeri* NRRL181 konnte ein orthologes Gen *ACLA_042210* (EAW09999) in *A. clavatus* identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten beide Gene kloniert und nach erfolgreicher Überproduktion in *E. coli* charakterisiert werden.

Folgende Arbeitsschritte waren vorgesehen:

- Amplifikation von *NFIA_062330* und *ACLA_042210* aus gDNA von *N. fischeri* und *A. clavatus* NRRL1
- Klonierung in den Expressionsvektor pQE60 und Expression der Gene in *E. coli* mit nachstehender Aufreinigung der überproduzierten Proteine
- Untersuchungen der Enzymaktivität mit Hilfe von Enzymassays in Anwesenheit von DMAPP und der Analyse durch die HPLC
- Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte und die Bestimmung der kinetischen Parameter der katalytischen Reaktion

Untersuchungen zur putativen Aminooxidase NFIA_043660 in der Biosynthese von Fellutaninen aus *N. fischeri*

Nach der Charakterisierung der Prenyltransferase CdpC2PT, welche unter anderem die Mono- und Diprenylierung von cyclo-L-Trp-L-Trp (Fellutanin B und C) katalysiert, konnte durch bioinformatische Methoden ein putatives Aminooxidasegen *NFIA_043660* in demselben Gencluster identifiziert werden. In dieser Arbeit sollte das Gen *NFIA_043660* in *E. coli* überexprimiert und die Funktion des überproduzierten Enzyms aufgeklärt werden.

Folgende Arbeiten waren vorgesehen:

- Amplifikation von *NFIA_043660* aus gDNA von *N. fischeri*
- Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektors (pQE60, pHIS8)
- Überexpression des Gens in *E. coli* und Isolierung des überproduzierten Enzyms EAW25547
- Untersuchungen des Proteins auf eine mögliche Beteiligung in der Fellutanin-Biosynthese in *N. fischeri* NRRL181 und Identifizierung des natürlichen Substrates
- Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte, sowie Bestimmung der kinetischen Parameter der katalytischen Reaktion

Charakterisierung der NRPS *Pc21g15480* und *NFIA_074300* durch Expression in *A. nidulans*

Die Funktion der NRPS *Pc21g15480* aus *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 wurde innerhalb der Roquefortin C Biosynthese durch „*knock out*“ Experimente belegt. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz konnte ein homologes Gen *NFIA_074300* mit noch unbekannter Funktion in *N. fischeri* NRRL181 nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit soll das Ergebnis der NRPS *Pc21g15480* *in vivo* bestätigt und die Funktion der NRPS *NFIA_074300* aufgeklärt werden. Zusätzlich sollen die erhaltenen Transformanten für eine spätere Koexpression mit Prenyltransferase-Genen zur Verfügung gestellt werden.

Folgende Arbeiten waren vorgesehen:

- Amplifikation von *NFIA_074300* und *Pc21g15480* aus gDNA von *N. fischeri* NRRL181 und *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255
- Klonierung in den Expressionsvektor pJW24
- Heterologe Expression in *A. nidulans* TN02A7 durch Protoplastierung
- Kultivierung der erhaltenen Transformanten und Analyse der Sekundärmetabolite per HPLC
- Isolierung und Strukturaufklärung der Produkte

Koexpression der NRPS *ftmPS* mit den Prenyltransferasen *cdpC2PT* oder *cdpC3PT* *in vivo* und Untersuchungen zur Sekundärstoffakkumulation in den Transformanten

Die *in vivo* Synthese von cyclo-L-Trp-L-Pro katalysiert durch die NRPS *FtmPS* konnte bereits in unserem Arbeitskreis nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte durch die gezielte Koexpression mit der Prenyltransferasegen *cdpC2PT* (*NFIA_043650*) oder *cdpC3PT* (*NFIA_074280*), die Sekundärstoffproduktion analysiert werden.

Folgende Arbeiten sollten durchgeführt werden:

- Amplifikation von *NFIA_043650* und *NFIA_074280* aus gDNA von *N. fischeri*
- Klonierung in den Expressionsvektor (pCaW34) für *A. nidulans* TN02A7
- Heterologe Expression in *A. nidulans* TN02A7 mit *ftmPS* durch Protoplastierung
- Kultivierung der erhaltenen Transformanten und Analyse der Sekundärmetabolite per HPLC
- Isolierung und Strukturaufklärung der Produkte

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme

3.1.1 Chemikalien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen Alfa Aesar (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden bevorzugt von den Firmen BD (Heidelberg) und AppliChem (Darmstadt) erworben. DMAPP wurde von Frau Lena Ludwig synthetisiert. GPP und FPP wurden freundlicherweise von Frau Dr. Edyta Stec synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die zyklischen Dipeptide cyclo-L-Trp-L-Pro, cyclo-L-Trp-D-Pro und cyclo-L-Trp-L-His wurden von Frau Dr. Xia Yu und die zyklischen Dipeptide cyclo-D-Trp-L-Pro und cyclo-D-Trp-D-Pro von Frau Beate Wollinsky synthetisiert und freundlicherweise für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt. Die vier Isomere von cyclo-Trp-Ala wurden von Frau Lena Ludwig synthetisiert und bereitgestellt. Zusätzlich benötigte zyklische Dipeptide wurden von der Firma Bachem (Bubendorf, Switzerland) erhalten. Einfache Indolderivate, Hydroxynaphthaline und Flavonoide wurden von den Firmen Acros Organics (Geel Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe), Bachem (Bubendorf, Switzerland), Roth (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und TCI (Eschborn) erworben. Die speziellen Chemikalien und Medienbestandteile sind in der nachstehenden Tab. 3-1 aufgelistet.

Tab. 3- 1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile.

Hersteller	Bezeichnung
Bioline GmbH, Luckenwalde	dNTP Mix 100 mM (jeweils 25 mM)
Eurisotop, Saarbrücken	Chloroform-D1, Methanol-D4, Dimethylsulfoxid-D6
Fermentas, St. Leon-Rot	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactosid (X-Gal)
Roth, Karlsruhe	Rotiphorese [®] Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bis-acrylamid), Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG), Natriumdodecylsulfat (SDS), 1,4-Dithiothreitol (DTT), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau R-250
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	2-Mercaptoethanol

3.1.2 Materialien zur Chromatographie

Die Säulenmaterialien wurden als Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen.

Tab. 3- 2: Chromatographiematerial.

Hersteller	Säulenmaterial
CS Chromatographie Service, Langerwehe	Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 4 mm) Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 10 mm)
GE Healthcare, Freiburg	HiLoad 16/60 Superdex (Fertigsäule) Sephadex G-25 PD-10, NAP-5 (Fertigsäulen)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

Tab. 3- 3: verwendete Mykotoxine.

Bezogen von	Mykotoxin
isoliert aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 von B. Wollinsky	12,13-Dihydroxyfumitremorgin C
isoliert aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 von B. Wollinsky	Fumitremorgin A
isoliert aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 von B. Wollinsky	Fumitremorgin B
AppliChem, Darmstadt	Verruculogen
isoliert aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 von B. Wollinsky	Verruculogen TR-2

3.1.3 Enzyme und Kits

Tab. 3- 4: Enzyme, Größenstandards und Kits.

Hersteller	Bezeichnung
Fermentas, St. Leon-Roth	GeneRuler DNA Ladder Mix, Restriktionsendonukleasen
GE Healthcare, Freiburg	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis
Invitrogen, Karlsruhe	SYBR [®] Safe DNA Gel Stain
Jena BioScience, Jena	Restriktionsendonukleasen, Phosphatasen T4-DNA-Ligase
NEB, Ipswich, USA	ProtoScript M-MuLV First Strain cDNA synthesis kit
Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA	E.Z.N.A. [™] Fungal RNA Miniprep Kit
Peqlab	Mid Range Polymerase
Promega, Mannheim	pGEM-T Easy Vector System I, Taq DNA Polymerase
Roth, Karlsruhe	RNase A

Roche Applied Science, Mannheim	Expand High Fidelity ^{Plus} PCR System Plus Expand Long Template PCR System
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i> , Lysozym
SLG Südlaborbedarf, Gauting	HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit

3.2 Plasmide, Primer, Mikroorganismen

3.2.1 Plasmide

Tab. 3- 5: Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Vektor	Beschreibung	Hersteller/Referenz
pGEM-T Easy	Linearisierter Vektor mit einem T-Überhang am 3'-Ende zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang am 3'-Ende, <i>lacZ</i> , <i>ori</i> , <i>f1 ori</i> , Amp ^R	Promega, Mannheim
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^R , <i>f1</i> -Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₈ -tag und C-terminalen (His) ₆ -tag	(Jez et al., 2000)
pJW24	Expressionsvektor für <i>A. nidulans</i> TN02A7, Amp ^R , <i>ColE1</i> -Origin, <i>pyrG</i>	(Calvo et al., 2004)
pQE-60	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, <i>ColE1</i> -Origin, Amp ^R , Sequenz für C-terminalen (His) ₆ -tag	Qiagen, Hilden

Tab. 3- 6: Plasmid-Konstrukt. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pKM03	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_062330</i> (NW_001509768; 216976-218337) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1373 bp; Primer KM_062330-1 und KM_062330-2) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM04	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_074300</i> (NW_001509762; 574554-581196) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (3576 bp; Primer KM_074300-1 und KM_074300-2) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM05	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> (NW_001509762; 6203976-6205399) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1379 bp; Primer KM_093400-1, KM_093400-2, KM_093400-3, KM_093400-4) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM07	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_074300</i> (NW_001509762; 574554-581196) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (3550 bp; Primer

	KM_074300-1 und KM_074300-2) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy + 6.7 kb aus pWY26
pKM08	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093400</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1370 bp <i>Sall</i> - <i>Xho</i> I-Fragment aus pKM05, kloniert in pHIS8
pKM09	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043650</i> (NW_001509774; 30825-32173) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1347 bp; Primer KM_043650-1, KM_043650-2, KM_043650-3, KM_043650-4) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM10	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_074300</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 6.8 kp <i>Spe</i> I/ <i>Not</i> I -Fragment aus pKM07 und pWY26, kloniert in pJW24
pKM11	Klonierungskonstrukt für <i>gpdA</i> (AACD01000139; 82580-84032) aus <i>A. nidulans</i> A4, PCR amplifiziertes Fragment (1453 bp; Primer CaW_gpdA_for/KM_gpdA_rev) aus gDNA von <i>A. nidulans</i> A4 kloniert in pGEM-T easy
KM12	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_074300</i> (NW_001509762; 574554-581196) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, Gelaufgereinigtes Fragment (496 bp; Terminatorbereich) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pJW24
pKM14	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_062330</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1361 bp <i>Nco</i> I/ <i>Bgl</i> II -Fragment aus pKM03, kloniert in pQE60
pKM16	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_043650</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1337 bp <i>Nco</i> I/ <i>Bgl</i> II -Fragment aus pKM09, kloniert in pQE60
pKM18	Klonierungskonstrukt für <i>ACLA_042210</i> (NW_001517097; 2612667-2614133) aus <i>A. clavatus</i> NRRL1, PCR amplifiziertes Fragment (1351 bp; Primer KM_042210-1, KM_042210-2,) aus gDNA von <i>A. clavatus</i> NRRL1 kloniert in pGEM-T easy
pKM19	Expressionskonstrukt für <i>ACLA_042210</i> aus <i>A. clavatus</i> NRRL1, 1340 bp <i>Nco</i> I- <i>Bgl</i> II Fragment aus pKM18, kloniert in pQE60
pKM20	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> (NW_001509762; 6203976-6205399) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1379 bp; Primer KM_093400-1, KM_093400-4) aus cDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM21	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093440</i> (NW_001509762; 6203976-6205399) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1379 bp; Primer KM_093400-1, KM_093400-4) aus cDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM22	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043660</i> (NW_001509774; 33178-34572) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1412 bp; Primer KM_043660-1, KM_043660-2) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM23	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_043660</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1402 bp <i>Nco</i> I- <i>Bgl</i> II -Fragment aus pKM22, kloniert in pQE60
pKM24	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043660</i> (NW_001509774; 33178-34572) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1412 bp; Primer KM_043660-3, KM_043660-4) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM25	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_043660</i> aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1402 bp <i>Nco</i> I- <i>Bgl</i> II -Fragment aus pKM22, kloniert in pHIS8

pKM26	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043650</i> (NW_001509774; 30825-32173) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1347 bp; Primer KM_043650-1, KM_043650-4) aus cDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM27	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043660</i> (NW_001509774; 33178-34572) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1412 bp; Primer KM_043660-1, KM_043660-2) aus cDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM28	Klonierungskonstrukt für <i>gpdA</i> (AACD01000139; 82570-84032) aus <i>A. nidulans</i> A4, PCR amplifiziertes Fragment (1463 bp; Primer KM_gpdA-1/KM_gpdA-2) aus gDNA von <i>A. nidulans</i> A4 kloniert in pGEM-T easy
pKM29	Klonierungskonstrukt für <i>TrpC</i> (E05643; 3573-4167) aus <i>A. nidulans</i> PCR amplifiziertes Fragment (1463 bp; Primer KM_TrpC-1/KM_TrpC-2) aus gDNA von <i>A. nidulans</i> A4 kloniert in pGEM-T easy
pKM30	Klonierungskonstrukt für <i>Pc21g15480</i> (NS_000201; 22862613-22869753) aus <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255, PCR amplifiziertes Fragment (7140 bp; Primer KM_Pc-15480-3, KM_Pc-15480-4) aus gDNA von <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 kloniert in pGEM-T easy
pKM31	Expressionskonstrukt pJW24 mit <i>gpdA</i> Promotor aus <i>A. nidulans</i> A4, 1463 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pKM28
pKM32	<i>Nco</i> I-geschnittenes pKM29-Konstrukt mit <i>Nco</i> I-Fragment aus pCaW34: 1325 bp <i>NFIA_094090</i> (EAW19789, 131098-132422) mit 434 bp von <i>TrpC</i> -Rest (E05643; 3573-4008)
pKM33	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043650</i> (NW_001509774; 30825-32173) mit Stop-Codon aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1347 bp; Primer KM_043650-1/KM_CdpC2PT_Stop) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM34	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_074280</i> (NW_001509762; 569344- 571063) mit Stop-Codon aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (1719 bp; Primer CdpC3PT_for / KM_CdpC3PT_Stop) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pKM35	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043650</i> mit Stop-Codon (NW_001509774; 30825-32173) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1347 bp <i>Nco</i> I/ <i>Bgl</i> II-Fragment aus pKM33 kloniert in pKM32
pKM36	Expressionskonstrukt für <i>Pc21g15480</i> aus <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255, 7140 bp <i>Not</i> I/ <i>Xba</i> I -Fragment aus pKM30, kloniert in pKM31
pKM37	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_074280</i> mit Stop-Codon (NW_001509762; 569344- 571063) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1719 bp <i>Nco</i> I/ <i>Bgl</i> II-Fragment aus pKM34 kloniert in pKM32
pKM38	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_043650</i> mit Stop-Codon (NW_001509774; 30825-32173) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 1781 bp <i>Nco</i> I-Fragment aus pKM35 kloniert in pCaW34
pKM39	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_074280</i> mit Stop-Codon (NW_001509762; 569344- 571063) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 2153 bp <i>Nco</i> I-Fragment aus pKM37 kloniert in pCaW34

3.2.2 Primer

Tab. 3- 7: Oligonukleotide. Fettmarkierte Buchstaben entsprechen mutierten Basen, die zu den kursiv markierten Restriktionsschnittstellen führten. (*Nco*I: CCATGG, *Not*I: GCGGCCG, *Bam*HI: GGATCC, *Hind*III: AAGCTT, *Bgl*II: AGATCT, *Sac*II: CCGCGG, *Sal*I: GTCGAC, *Spe*I: ACTAGT, *Xba*I: TCTAGA, *Xho*I: CTCGAG). Unterstrichene Buchstaben stellen überlappende Bereiche dar.

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid/Referenz
KM_062330-1	TC ACC ATGGCTATACCATCAATTCC	pKM03
KM_062330-2	AAT AGATCT TTTCATCTCGCGAGCGC	pKM03
KM_074300-1	TCTAGATTAGATCT GACTTGGGAAGGT GCAAT	pKM04
KM_074300-2	AAGCTTACTAGT TTTGTCTCCCTGGATCT TTC	pKM04
KM_093400-1	AC GTCGAC TTATGACTATCCACCCA	pKM05, pKM20, pKM21
KM_093400-2	GATAATTTAAAAACATATT ACCCTAGG TGTGATCTTGACAAAACATCCGG	pKM05
KM_093400-3	CCGGATGTTTTGTCAAGATCACACCTA GGGTAATATGTTTTTAAATTATC	pKM05
KM_093400-4	ACTCGAG CTAAGCGCCAATTTTCCA	pKM05, pKM20, pKM21
KM_043650-1	T ACC ATGGCTATCAACTCTAGATGTGG ACTAGCG	pKM09, pKM26, pKM33
KM_043650-2	TCGGTGCTACGTGACCTCTAT TCCTGAG GAAGACATCAGTAAATGTACTCA	pKM09
KM_043650-3	TGAGTACATTTACTGATGTCTTCCTCA GGATAGAGGTCACGTAGCACCGA	pKM09
KM_043650-4	AA AGATCT CAAAGACCGTTTCGCAGAG CG	pKM09, pKM26
CaW_gpdA_for	CT GCGGCCGC ATTGATCATCCGATAGC TC	pKM11
KM_gpdA_rev	GATA AGATCT GGTGATGTCTGCTCAAG CG	pKM11
KM_042210-1	TC ACC AT G CCGTAACAGCCCCCTCT	pKM18
KM_042210-2	CA AGATCT CTCCTCACCGTACTGCT	pKM18
KM_043660-1	C ACC AT G GCAGTCGACGCCATATTCGT GCC	pKM22, pKM27
KM_043660-2	TG AGATCT AGCAATATTTCTCAACATA TCC	pKM22, pKM27
KM_043660-3	CT GGATCC ATGCGAGTCGACGCCATAT TCG	pKM24
KM_043660-4	G ACTCGAG TTAAGCAATATTTCTCAAC ATA	pKM24
KM_gpdA-1	GGATCC ATTGATCATCCGATAGCTC	pKM28
KM_gpdA-2	TCTAG AGGTGATGTCTGCTCAAGCG	pKM28
KM_TrpC-1	CCGCGGGGG CCCATGTCAACAAGAA	pKM29
KM_TrpC-2	GCGGCCG CCCGAGTGGAGATGTGGA	pKM29

KM_Pc-15480-3	CATCTCTAGAAATGGATTCTTATCTTGGT CGTGATA	pKM30
KM_Pc-15480-4	TGCGCGGCCGCCTAATGCTTGGTGCAC TCGTAGAC	pKM30
KM-PC15480-5	GGAGAGAGAATGGTGAGATCTCGCGG ACGTCTTTG	PCR-Screening <i>Pc21g15480-</i> Transformanten
KM_043650_Stop	AAAGATCTTCACAAAGACCGTTTCGCA GAG	pKM33
CdpC3PT_for	ATTCCATGGCAGTGTCGTCGACCG	pKM34
KM_CdpC3PT_Stop	GAAGATCTCTAGTGGTAGTACATGGTC AGG	pKM34
KM_Afu8G00540-1	GCGATACAAGACCTTCTTATGATCC	PCR-Screening <i>NFIA_074300-</i> Transformanten
KM_Afu8G00540-2	CTGGCCATGCGGCATAAGACCATTC	
KM_074300-3	AAAATTGTGGACAGTACCGTGACTCTT ACGT	
KM_074300-4	GCCAGATCCCCTGTCTTGTAGAACCGA TGTC	

3.2.3 Mikroorganismen

3.2.3.1 Bakterienstämme

Tab. 3- 8: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme.

Anbieter	Bakterienstamm	Genotyp
Invitrogen, Karlsruhe	BL21(DE3)pLysS	F - <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)
Invitrogen, Karlsruhe	DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
Qiagen, Hilden	M15 [pREP4]	<i>Nal^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁺ Gal⁺ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺</i>
Qiagen, Hilden	SG13009 [pREP4]	<i>Nal^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁻ Gal⁺ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺</i>
Genlantis	SoluBL21™	F - <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)†
Stratagene	XL1-Blue MRF'	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]
Stratagene	XL10 Gold	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI^q</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]‡

† Der Stamm enthält uncharakterisierte Mutationen, die durch spezielle Selektionskriterien erhalten wurden. Diese Mutationen machen es dem Stamm möglich, unlösliche Proteine vollständig oder teilweise in löslicher Form zu exprimieren. (Herstellerangabe)

‡ Angegebene Gene bezeichnen Mutanten-Allele. Gene auf dem F' Episom, sind unverändert, außer sie sind speziell gekennzeichnet. (Herstellerangabe)

3.2.3.2 Pilzstämme

Tab. 3- 9: Übersicht über die verwendeten Pilzstämme.

Referenz	Pilzstamm	Beschreibung
Agricultural Research Service Culture Collection of the United States	<i>A. clavatus</i> NRRL1	-
Fungal Genetics Stock Center	<i>A. nidulans</i> A4	Glasgow wild type (veA ⁺)
Prof. Berl R. Oakley	<i>A. nidulans</i> TN02A7	<i>pyrG89; pyroA4, nkuA::argB; riboB2</i>
Agricultural Research Service Culture Collection of the United States	<i>N. fischeri</i> NRRL181	-
DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)	<i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	ATCC28089

3.3 Nährmedien und Puffer

3.3.1 Nährmedien

Nachfolgend sind alle verwendeten Medien für die Kultivierung aufgeführt. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 Liter Medium. Zur Herstellung von Festmedien wurden den Medien 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren (20 min, 121 °C) zugegeben. Die Lagerung der hergestellten Medien erfolgte bei 4 °C.

3.3.1.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Nach dem Herstellen und Autoklavieren der Medien, wurden zur Selektion verschiedene Antibiotika (Tab. 3-10) steril zugesetzt.

LB-Medium

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Die Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

TB-Medium

Bacto-Trypton	12,0 g
Bacto-Hefeextrakt	24,0 g
Glycerin (≥ 99,5 %)	4,0 ml

Die Bestandteile wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 100 ml einer sterilen Lösung von 0,17 M KH_2PO_4 und 0,72 M K_2HPO_4 zugegeben.

SOB-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,2 g
MgCl_2	0,952 g
MgSO_4	2,408 g

SOC-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,2 g
MgCl ₂	0,952 g
MgSO ₄	2,408 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurden 20 ml einer sterilen 1 M Glucoselösung steril zugegeben.

3.3.1.2 Nährmedien zur Kultivierung von *A. nidulans*

Zur Herstellung der entsprechenden Medien wurden zur Selektion die benötigten Auxotrophiemarker (Tab. 3-11) vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

AMM-Medium

NaNO ₃	6,0 g
Glucose	10,0 g
KCl	0,52 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,52 g
KH ₂ PO ₄	1,52 g

CDH-Medium

Czapex Dox	35,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Agar	16,0 g

GMM-Medium

Glucose	10,0 g
20 x Nitratsalze (Tab. 3-19)	50,0 ml

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, der pH auf 6,5 eingestellt und autoklaviert.

HA - Medium

Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Glucose	4,0 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, der pH auf 5,5 eingestellt und autoklaviert.

YAG-Medium

Hefeextrakt	5,0 g
Glucose	20,0 g
Agar	15,0 g

3.3.1.3 Nährmedien zur Kultivierung von *A. clavatus*CDH-Medium

Czapex Dox	35,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Agar	16,0 g

3.3.1.4 Nährmedien zur Kultivierung von *N. fischeri*PDAS-Medium

Potato Dextrose	24,0 g
Saccharose	342,3 g
Agar	16,0 g

3.3.1.5 Nährmedien zur Kultivierung von *P. chrysogenum*YME-Medium

Malzextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Glucose	4,0 g

3.3.2 Antibiotika und Auxotrophiemarker**3.3.2.1 Antibiotika**

Antibiotikallösungen wurden auf Vorrat hergestellt und bei -20 °C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Bei Festmedien fand die Zugabe von Antibiotika unter sterilen Bedingungen nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 60 °C statt.

Tab. 3-10: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konz. der Stammlösung [mg/ml] (Lösungsmittel)	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Hersteller
Carbenicillin	50 (H ₂ O)	50	Roth
Chloramphenicol	50 (EtOH)	12,5	Roth
Kanamycin	50 (H ₂ O)	25	Roth
Tetrazyklin	12,5 (H ₂ O)	12,5	Roth

3.3.2.2 Auxotrophiemarker

Tab. 3-11: Verwendete Auxotrophiemarker.

Auxotrophiemarker	Endkonzentration [g/l]	Hersteller
L-Arginin	0,5	Roth
Pyridoxin Hydrochlorid	0,5	Roth
Riboflavin	0,0025	Roth
Uracil	1,0	Acros Organics
Uridin	2,4	Roth

3.3.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Puffer mit bidest. Wasser angesetzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tab. 3-12: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Miniprep-Lösung I	Tris-Base	50 mM
	EDTA	10 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren. Vor Gebrauch 100 µg/ml RNase A zugeben.	
Miniprep-Lösung II	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)
Miniprep-Lösung III	Kaliumacetat	3 M
TE-Puffer	Auf pH 5,2 einstellen und autoklavieren.	
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.	

Tab. 3-13: Puffer und Lösungen zur Isolierung von DNA aus Pilzen.

Puffer	Zusammensetzung	
Breaking buffer	NaCl	100 mM
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	Triton 100	2 % (v/v)
	SDS	1 % (w/v)
Auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.		
Lysispuffer	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	50 mM
	SDS	3 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	1 %
Digestion buffer (DB)	NaCl	100 mM
	Trizma Base	10 mM
	EDTA	25 mM
	SDS	0,5 % (w/v)
Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.		

3.3.3.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von *E. coli*

Tab. 3-14: Puffer und Lösungen zur Transformation von *E. coli*.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
0,1 M CaCl ₂ -Lösung	Calciumchlorid	0,1 M
0,1 M CaCl ₂ -Lösung (mit Glycerin)	Calciumchlorid	0,1 M
	Glycerin	0,15 % (v/v)
10 %ige Glycerin-Lösung	Glycerin	10 % (v/v)
TB-Lösung	PIPES	10 mM
	Calciumchlorid	15 mM
	Kaliumchlorid	250 mM

3.3.3.3 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tab. 3-15: Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese.

Puffer	Zusammensetzung	
50 x TAE-Puffer	Tris-Base	2 M
	Essigsäure 96 %	6 % (v/v)
	EDTA	50 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.	
6 x Ladepuffer	Glycerin	30 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

3.3.3.4 Puffer zur Proteinaufreinigung

Tab. 3-16: Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie.

Puffer	Zusammensetzung	
Lysepuffer (Lagerung: 4 °C)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.	
Waschpuffer (Lagerung: 4 °C)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.	
Elutionspuffer (Lagerung: 4 °C)	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.	
Proteinlagerungspuffer (Lagerung: 4 °C)	Tris-HCl	50 mM (pH 7,5)
	Glycerin	15 % (v/v)
	Auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.	

3.3.3.5 Puffer und Lösungen zur Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamid Gel-elektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Tab. 3-17: Puffer und Lösungen zur SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Puffer	Zusammensetzung	
Trenngel 12 %	bidest. Wasser	6,8 ml
4 Gele:	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5 ml
(8 cm × 5,8 cm	10 % (w/v) SDS	200 µl
× 0,75 mm)	Rotiphorese® Gel 30	8,0 ml
	10 % (w/v) APS	300 µl
	TEMED	10 µl
Sammelgel 4 %	bidest. Wasser	3,05 ml
4 Gele:	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
(8 cm × 1,5 cm	10 % (w/v) SDS	50 µl
× 0,75 mm)	Rotiphorese® Gel 30	650 µl
	10 % (w/v) APS	150 µl
	TEMED	10 µl
10 × SDS-Puffer	Tris-Base	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 % (w/v)
	bidest. Wasser	ad 500 ml
5 × Protein-	Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM
Probenpuffer	DTT	500 mM
(Lagerung: -20 °C)	SDS	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	bidest. Wasser	ad 10 ml
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau G-2500	1 % (w/v)
Coomassie	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	50 % (v/v)
	bidest. Wasser	ad 1000 ml
Entfärberlösung	Ethanol	20 %
Coomassie	Essigsäure	10 %
	bidest. Wasser	ad 500 ml

3.3.3.6 Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford-Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Tab. 3-18: Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford-Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung.

Puffer	Zusammensetzung	
FPLC-Puffer (Lagerung: 4 °C)	Tris-Base	50 mM
	NaCl	150 mM
Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.		
5 × Bradford Reagenz (Lagerung: 4 °C)	Serva Blau G	70 mg (in 50 ml EtOH)
	Phosphorsäure (85 %)	50 % (v/v)
	bidest. Wasser	ad 200 ml
Das 5 × Bradford Reagenz wurde über Nacht im Dunkeln bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag über einen Faltenfilter (Bradford 1976) filtriert.		

3.3.3.7 Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans* TN02A7

Tab. 3-19: Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans* TN02A7

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Tween-Lösung	Tween [®] 20	0,1 % (v/v)
Lösung A für das Osmotische Medium	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,1 M
Lösung B für das Osmotische Medium	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 M
Lösung C für das Osmotische Medium	Lösung A	7,0 ml
	Lösung B	93,0 ml
Auf pH 7,9 einstellen und autoklavieren.		
Osmotische Medium	Mg ₂ SO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 M
	Lösung C	5,0 ml
Auf pH 5,2 einstellen, sterilfiltrieren und Lagerung bei 4 °C.		
Trapping Buffer	Sorbitol	600 mM
	Tris-HCl	100 mM
Auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren und Lagerung bei 4 °C		
STS Puffer	Sorbitol	1,2 M

	Tris-HCl	10 mM
	CaCl ₂	10 mM
Auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren und Lagerung bei 4 °C.		
CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂	1,0 M
PEG-Lösung	PEG3350	60 % (v/v)
Calcium-PEG-Lösung	1 M CaCl ₂	150 µl
	PEG-Lösung	2,85 ml
Vor jedem Gebrauch frisch herstellen.		
20x Nitratsalze	NaNO ₃	120,0 g
	KCl	10,4 g
	Mg ₂ SO ₄ x 7 H ₂ O	10,4 g
	KH ₂ PO ₄	30,4 g
Spurenelemente	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,2 g
	H ₃ BO ₃	1,1 g
	MnCl ₂ x H ₂ O	0,5 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
	CoCl ₂ x 5 H ₂ O	0,16 g
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,16 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,11 g
	Na ₄ EDTA	5,0 g
	bidest. Wasser	ad 100 ml
Auf pH 6,5 einstellen und sterilfiltrieren.		
Bottom-Medium	Czapek Dox	35 g
	Saccharose	0,8 M
	Agar	16 g
Top-Agar	20x Nitratsalze	10 ml
	Spurenelemente	0,5 ml
	Glucose	2 g
	Sorbitol	44 g
	Agar	1,5 g
Auf pH 6,5 einstellen und vor Verwendung auf 40 °C abkühlen lassen.		

3.4 Bioinformatische Methoden

In dieser Arbeit wurde für die Vorhersage von Intron-Exon-Sequenzen vorwiegend die Software FGenesH von Softberry (<http://linux1.softberry.com>) und die *Aspergillus* Comparative Database vom *Broad Institute* (<http://broadinstitute.org>) verwendet. Mit Hilfe der Programme Blast (Basic Local Alignment Search-Tool) und Blast2Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) wurden Nucleotid- und Aminosäuresequenzen mit anderen Sequenzen der NCBI-Datenbank verglichen. Bei Nucleotid-Vergleichen wurde BlastN oder BlastX verwendet und bei Aminosäuresequenzen wurde auf BlastP zurückgegriffen. Für die Multi-Proteinsequenzvergleiche wurde das Programm „ClustalW2“ genutzt.

3.5 Methoden der Mikrobiologie

3.5.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB- oder TB-Flüssigmedium (3.3.1.1) bzw. auf LB-Agar-Platten bei 37 °C unter Zusatz verschiedener Antibiotika zur Selektion (Tabelle 3-10). Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm über Nacht (16 h) inkubiert. Zur Verbesserung der Expressionsbedingungen erfolgte die Kultivierung bei 22 oder 30 °C für 6 oder 16 h. *E. coli*-Dauerkulturen wurden durch das Mischen von 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerin (Endkonzentration 20 % v/v) hergestellt und bei -80 °C gelagert.

3.5.2 Kultivierung von Ascomyceten

3.5.2.1 Kultivierung von *A. clavatus*

Die Anzucht von *A. clavatus* wurde in CDH-Flüssigmedium als Standkultur bei 25 °C durchgeführt.

3.5.2.2 Kultivierung von *A. nidulans*

Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte wenn erforderlich in AMM-, CDH-, GMM-, HA- oder YAG-Medium (Kapitel 3.3.1.2) unter Zugabe der benötigten Auxotrophiemarker (Tabelle 3-11) bei 30 oder 37 °C im Dunkeln. Flüssigkulturen wurden zusätzlich unter Schütteln bei 130 rpm inkubiert.

3.5.2.3 Kultivierung von *N. fischeri*

Die Anzucht von *N. fischeri* wurde in PDS-Flüssigmedium (Kapitel 3.3.1.4) bzw. auf PDS-Platten mit 1,5 % (w/v) Agar (PDAS) bei 25 °C im Dunkeln vorgenommen. Benötigte Flüssigkulturen wurden zusätzlich unter Schütteln bei 130 rpm inkubiert.

3.5.2.4 Kultivierung von *P. chrysogenum*

Die Kultivierung von *P. chrysogenum* erfolgte in YME-Medium (3.3.1.5) bei 25 °C im Dunkeln.

3.5.3 Herstellung einer Sporensuspension

Die Herstellung der Sporensuspension erfolgte je nach Sporulationsgrad von 2-4 Platten. Auf jede sporulierende Platte wurden vorsichtig 3 ml einer 0,1 % Tween[®]-20 Lösung gegeben und die Sporen sowie Teil des Mycel mit Hilfe einer abgeflammten Impföse vom Agar gelöst. Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Platten zweimal mit je 3 ml einer 0,1 % Tween[®]-Lösung gewaschen. Die erhaltenen Suspensionen wurden in dem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt und mit Hilfe von autoklavierten Glasperlen (Ø 2,85-3,45 mm) bis zu einer homogenen Suspension gevortext. Um die Sporen von überflüssigen Mycel und Agarresten zu trennen, wurde die Suspension über Watte filtriert und bei 3000 x g für 3 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet mikroskopiert und in 500 µl einer sterilen 20 %igen Glycerin-Lösung resuspendiert. Nach dem Aliquotieren erfolgte das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei -80 °C. Zur Bestimmung des Titters wurden 8 Verdünnungsstufen (10^{-1} bis 10^{-8}) der Sporensuspension hergestellt. 100 µl von jeder Verdünnungsstufe wurden auf entsprechenden Medien ausgestrichen und für 2 bis 5 Tage bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert.

3.6 Methoden der Molekularbiologie

3.6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten

3.6.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion

Das Mycel für die Isolierung der DNA von verschiedenen Ascomyceten wurde aus einer 100 ml Standkultur in dem entsprechenden Medium nach der Inkubation bei 25 °C für 4 bis 5 Tage gewonnen. Die Flüssigkultur wurde in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 Volumenteil eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Das Mycel-Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels Mörser zerkleinert. 100 mg Mycel wurden 1,2 ml DB-Puffer mit Proteinase K (0,1 mg/ml) zugegeben und für 2 Stunden bei 50 °C unter Schütteln bei 160 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) zugefügt und für 1 min gevortext. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 x g und 4 °C wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wenn erforderlich mehrmals wiederholt. Durch die Zugabe des 0,1-fachen Volumens einer kalten 3 M Natriumacetat-Lösung und ein- bis zweifachen Volumens einer 100 %igen Isopropanol-Lösung wurde die DNA gefällt. Nach der Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C für 45 Minuten wurde die DNA mit 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in autoklaviertem bidest. Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.6.1.2 DNA-Isolierung aus *A. nidulans* TN02A7 und seinen Transformanten

Bereits gewonnenes, tiefgefrorenes Mycel wurde unter Verwendung von flüssigem Stickstoff gemörsert und bis zur Hälfte in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 1 ml Lysispuffer wurde das Gemisch bei 68 °C für 30 Minuten inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden mittels Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C für 10 Minuten abgetrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0; Carl Roth) versetzt. Der Ansatz wurde sorgfältig gevortext, für 10 Minuten auf Eis gelagert und erneut zentrifugiert. Diese Schritte wurden insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und mit dem ein-bis zweifachen Volumen einer eiskalten 100 %igen Isopropanol-Lösung vermischt. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 10 Minuten wurde die DNA durch Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C für 30 min gefällt und anschließend mit dem 0,5-fachen

Volumen einer 70 %igen Ethanol-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 100 µl autoklaviertem bidest. Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.6.2 Isolierung von RNA aus *N. fischeri* und Herstellung von cDNA

Das Mycel für die Isolierung der RNA von *N. fischeri* NRRL181 wurde aus einer 100 ml Standkultur (HA-Medium, Kapitel 3.3.1.2), die bei 25 °C für 4 bis 5 Tage im Dunkeln kultiviert wurde, gewonnen. Das Mycel wurde in 50 ml Reaktionsgefäßen bei $6000 \times g$ und 4 °C für 10 min pelletiert und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Mycel mit Hilfe flüssigem Stickstoffs in einem Mörser zerrieben und schließlich 75 mg Mycel in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der RNA erfolgte dann mit Hilfe des E. Z. N. A. Fungal RNA Miniprep Kits (Omega Bio-Tek) nach dem Protokoll des Herstellers. Wie vom Hersteller vorgeschlagen, wurde zur Reduzierung von gDNA-Rückständen ein Verdau mit DNase I während der Aufreinigung durchgeführt. Am Ende wurde die RNA zweimal mit 50 µl H₂O eluiert. Zur cDNA-Synthese wurde das ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) genutzt. Für den Ansatz wurden 6 µl der zuvor isolierten Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers inkubiert. Es wurden die Oligo d(T)₂₃VN- und Random-Primer des Herstellers verwendet.

3.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Alle Plasmid-Isolierungen dieser Arbeit wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt. *E. coli* Einzelkolonien wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm über Nacht in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Aus einer Übernachtskultur wurden 2 ml der Bakterienkultur entnommen und die Zellen bei $5000 \times g$ für 4 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl der Miniprep Lösung I (Tabelle 3-12) resuspendiert, mit 250 µl der Miniprep Lösung II gemischt (Tabelle 3-12) und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 250 µl der Miniprep Lösung III (Tabelle 3-12) zugegeben, die Lösung durch fünfmaliges Invertieren gemischt und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei $14000 \times g$ wurde der lösliche Überstand abgenommen und mit 750 µl einer eiskalten Isopropanol-Lösung gefällt. Nach mehrmaligem Invertieren wurde die DNA bei $14000 \times g$ für 30 min gefällt und das entstandene DNA-Pellet mit 700 µl einer eiskalten 70 %igen Ethanol-Lösung gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 10 min bei 65 °C getrocknet und in 50 µl autoklaviertem bidest. Wasser gelöst.

Bei der Maxipräparation wurde eine abgewandelte alkalische Lyse durchgeführt. Einzelne ausgewählte *E. coli*-Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion kultiviert. Das Pellet der Bakterienkultur (Zentrifugation 5000 x g, 5 min, 4 °C) wurde in 5 ml Lösung Miniprep Lösung I durch Vortexen resuspendiert, mit 10 ml Lösung Miniprep Lösung II gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 7,5 ml Miniprep Lösung III die Ausfällung der genomischen DNA. Nach Filtration durch einen Papierfilter wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte unter Zugabe von einem Volumen einer eiskalten Isopropanol-Lösung und anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 11000 x g für 45 min. Nach Trocknung bei 60 °C wurde die DNA in 300 µl autoklaviertem bidest. Wasser gelöst.

3.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden in einem MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Ein PCR-Ansatz mit der *Taq*-Polymerase (Tabelle 3-20) diente dazu, die für die jeweiligen Primer optimale Anlagerungstemperatur zu bestimmen. Je 10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Kapitel 3.6.5). Anschließend wurde eine PCR mit einer ausgewählten Anlagerungstemperatur mit dem Expand High Fidelity^{Plus} PCR System von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bei Bedarf wurde zur Eliminierung einer Intronsequenz eine Fusions-PCR durchgeführt. In der 1. PCR-Runde erfolgt hierbei die getrennte Amplifikation beider Exons mit speziellen Primern. Durch die verwendeten Primer wird an jedem Exon ein Sequenzüberhang angefügt, der aus einem Teil der Sequenz des anderen Exons besteht. So entstehen folglich zwei separate Exons mit einem entsprechenden Sequenzüberhang des jeweils anderen Exons. In einer 2. PCR-Runde hybridisieren die komplementären Überhänge miteinander, die Intronsequenz wird dadurch eliminiert und die Polymerase kann die entstandene Sequenz vervielfältigen.

Tab. 3-20: Standard-PCR-Ansatz für die *Taq*-Polymerase.

Substanz	Endkonzentration
<i>Taq</i> -Puffer (10 x)	1 x
dNTP Mix 1:10 (2,5 mM von jedem dNTP)	200 µM von jedem dNTP
Plasmid-DNA/gDNA	10-100/100-300 ng
Primer	0,4 µM
<i>Taq</i> -Polymerase (1-3 U/µl)	1-3 U
Gesamt-Volumen	50 µl

Tab. 3-21: Standard-PCR-Ansatz für die Expand High Fidelity^{Plus} PCR System bzw. Expand Long Template PCR System.

Substanz	Endkonzentration
Reaktionspuffer (5 x)	1 x
Nucleotid Mix	200 µM
Plasmid-DNA/gDNA	10-100/100-300 ng
Primer	0,4 µM
Expand High Fidelity-Polymerase (5 U/µl)	2,5 U
Gesamt-Volumen	50 µl

Tab. 3-22: Standard-PCR-Programm für die *Taq*-Polymerase (links) und das Expand High Fidelity^{Plus} PCR System bzw. Expand Long Template PCR System (rechts).

Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
94 °C	3 min	1	94 °C	3 min	1
94 °C	45 s	35	94 °C	45 s	35
T _a	1-2 min	35	T _a	1-2 min	35
72 °C	variabel (Tab.)	35	68-72 °C	variabel (Tab.)	35
72 °C	7 min	1	68-72 °C	7 min	1
4 °C	∞		4 °C	∞	

Tab. 3-23: Übersicht über die genspezifischen Anlagerungstemperaturen (T_a).

Gen	Anlagerungstemperatur
<i>gpdA</i>	63 °C
<i>TrpC</i>	61 °C
<i>NFIA_043650</i>	59 °C
<i>NFIA_062230</i>	59 °C
<i>NFIA_093400</i>	58 °C
<i>NFIA_043660</i>	61 °C
<i>NFIA_074300</i>	61 °C
<i>Pc21g15480</i>	64 °C
<i>ACLA_042210</i>	58 °C

3.6.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die für die Agarosegel-Elektrophorese verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 3-15 aufgeführt. Die Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Elektrophorese. Dabei wurden je nach gewünschten Trennbereich Agarosegele mit einer Konzentration von 0,6 bis 1,5 % Agarose in 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur späteren Detektion wurden 100 ml Gellösung mit 6 µl SYBR[®] Safe DNA Farbstoff (Invitrogen) versetzt. Die DNA-Proben wurden nach Mischen mit 6 × DNA-Ladepuffer im Verhältnis 6:1 auf das Agarosegel aufgetragen. Als Laufmittel diente ebenfalls 1 × TAE-Puffer und die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 90 V (Compact-Mini Kammer MBT 20 EL) bzw. 120 V (Compact-Midi Kammer MBT 30 EL). Als Größenstandard diente der GeneRuler DNA Ladder Mix der Firma Fermentas. Da der SYBR[®] Safe DNA Farbstoff DNA-interkalierend ist, konnte die Detektion mittels UV-Licht erfolgen und mit der Kamera Olympus SP-500 UZ mit einem UV-Filter dokumentiert werden.

3.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der jeweiligen Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.5), wurden die linearen DNA-Fragmente unter UV-Licht identifiziert und mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mittels des HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit von Südlaborbedarf (Kapitel 3.1.3) nach Protokollvorgabe des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit autoklaviertem bidest. Wasser.

3.6.7 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdaue zur Analyse von DNA wurden in einem Volumen von 10 µl mit verschiedenen Restriktionsenzymen und in den mitgelieferten Reaktionspuffern unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Präparative Restriktionsverdaue zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in größeren Volumina bis zu 100 µl durchgeführt.

3.6.7.1 partielle Restriktion

Das Plasmid pKM32 (*cdpNPT*) wurde über eine partielle Restriktion verdaut, da die Gensequenz von *cdpNPT* eine interne *NcoI*-Schnittstelle (Kapitel 4: Abb. 4-62) enthielt. Daher wurde das Plasmid zunächst mit dem Enzym, das nur einmal in dem Plasmid schneidet (*BglII*),

für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Plasmid mit dem zweiten Enzym, von dem nur ein Zehntel (0,025 U/μl) der Standardmenge verwendet wurde, für unterschiedliche Zeiten (30 - 300 s) bei 37 °C inkubiert. Nach dem entsprechenden Zeitintervall erfolgte das Abstoppen der Proben durch die Zugabe des 6 × DNA-Ladepuffers und die Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.5). Nach dem Auswählen des optimalen Zeitintervalls wurde der gleiche Ansatz in einem größeren Volumen unter den getesteten Bedingungen inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte das jeweils benötigte Gesamt-DNA-Fragment, in dem beide Enzyme nur einmal geschnitten haben, aus dem Agarosegel isoliert werden (Kapitel 3.6.6).

3.6.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines PCR-Produkts in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 bei kleinen Inserts und bis 4:1 bei größeren Inserts eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde entweder direkt nach der PCR eingesetzt oder zuvor durch Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion aufgereinigt. Die Ligation erfolgte mit der Ligase und dem Puffer aus dem pGEM-T Easy Vector System über Nacht bei 4 °C. Für die Umklonierung der DNA-Fragmente aus dem Klonierungsvektor in den entsprechenden Expressionsvektor, wurden sowohl der Zielvektor als auch der Ausgangsvektor mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert und separat voneinander aufgereinigt. Die Ligation für die Umklonierung in den entsprechenden Expressionsvektor erfolgte mit T4-DNA-Ligase von Jena Bioscience (Jena) für 16 h bei 4 °C. In Tab. 3-24 ist die Zusammensetzung der Ligationsansätze aufgelistet. Die Ligationsansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet (Kapitel 3.6.9).

Tab. 3-24: Ligationsansatz für pGEM-T Easy (links) bzw. den Expressionsvektor (rechts).

Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
PCR-Produkt	3,5 μl	Vektor	Variabel (abhängig von Konzentration)
pGEM-T Easy	0,5 μl	Insert	Variabel (abhängig von Konzentration)
T4-DNA Ligase	1,0 μl	10 x T4-Ligase Puffer	1 μl
2 x Rapid Buffer	5,0 μl	T4-DNA Ligase	2 μl
Gesamt-Volumen	10 μl	Gesamt-Volumen	20 μl

3.6.9 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

3.6.9.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. 100 ml LB-Medium wurden nach der Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit 10 µl *E. coli* Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 3 ml dieser Vorkultur in 100 ml frisches LB-Antibiotikum-Medium überführt und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden bei 6000 × g und 4 °C für 10 min pelletiert und in 30 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl₂-Lösung (Tab. 3-14) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 6000 × g und 4 °C wurde das Pellet wiederum in 20 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach für 10 min bei 6000 × g und 4 °C pelletiert und in 3 bis 5 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin (Tab. 3-14) vorsichtig resuspendiert. Von den Zellen wurden 100 µl und 200 µl Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

3.6.9.2 Herstellung ultra-kompetenter Zellen

100 ml SOB-Medium wurden nach der Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit 10 µl *E. coli* Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 ml dieser Vorkultur in 500 ml frisches SOB-Antibiotikum-Medium überführt und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 × g und 4 °C für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 160 ml einer eiskalten TB-Lösung (Tab. 3-14) resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 x g und 4 °C für 10 min wurde das Zellpellet nach Zugabe von 40 ml einer eiskalten TB-Lösung und 2,8 ml einer DMSO-Lösung vorsichtig resuspendiert. Von den Zellen wurden 400 µl Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.6.9.3 CaCl₂ -vermittelte Transformation von *E. coli*

Für die Hitzeschock-Transformation wurden pro Transformationsansatz 200 µl chemisch-kompetente oder ultrakompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend der gesamte Ligationsansatz hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Nach weiteren 90 s auf Eis wurden 600 µl SOC-Medium (Kapitel 3.3.1.1) ohne Antibiotikum zugegeben und die Zellen für 1 bis 2 h bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 4000 × g für 5 min pelletiert, der Überstand bis auf etwa 200 µl abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.10 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

3.6.10.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

10 ml LB-Medium wurden nach der Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit 10 µl *E. coli* Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 3 ml dieser Vorkultur in 100 ml frisches LB-Antibiotikum-Medium überführt und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden für 5 min bei 3000 × g und 4 °C zentrifugiert und nach der Zugabe von 50 ml einer eiskalten 10 %igen Glycerin-Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut für 5 min bei 3000 × g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 2 bis 5 ml einer 10 %igen Glycerin-Lösung resuspendiert. Von den Zellen wurden 50 µl Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.6.10.2 Elektroporation

Nach Zugabe von ca. 1 µg DNA zu 50 µl elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde die Mischung in eine eiskalte Elektroporationsküvette (Ø 2 mm) überführt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Konstanten durchgeführt: 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Nach dem elektrischen Puls wurde 600 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C und 180 rpm für 1 bis 2 h regeneriert. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 4000 × g und 4 °C für 5 min erfolgte die Selektion auf einer LB-Agar Platte mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C über Nacht.

3.6.11 Blau-Weiß-Selektion

Die Methode der Blau-Weiß-Selektion wurde zur Überprüfung von Ligationsansätzen bzw. *E. coli*-Transformationen mit dem Klonierungsvektor pGEM-T easy verwendet. Hierbei wird durch die Zugabe von IPTG, einem Galaktose-Analogon, die Expression des *lacZ*-Gens in dem pGEM-T Easy Vektor durch die Bindung von IPTG an den Repressor induziert. Der zuvor ebenfalls zugegebene Indikator X-Gal wird von der β -Galaktosidase gespalten, was eine Blaufärbung der Bakterienkolonie zur Folge hat. Die Blaufärbung ist der Nachweis für eine intakte MCS (Multi Cloning Site) und zeigt das keine Aufnahme an Fremd-DNA erfolgt ist. Die Weißfärbung von *E. coli* Einzelkolonien ist hingegen ein Indiz dafür, dass eine Aufnahme an Fremd-DNA stattgefunden hat. Durch Aufnahme eines Inserts in die MCS, wird das in dem Plasmid enthaltende *lacZ*-Gen unterbrochen und somit die Synthese der funktionsfähigen β -Galaktosidase gehemmt. Die Weiß-gefärbten Kolonien können anschließend zur weiteren Analyse von der LB-Agar Platte gepickt werden. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden 6,7 μ l einer sterilen IPTG-Lösung (1 M) und 40 μ l einer X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) mit 153,3 μ l bidest. Wasser gemischt und auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Zur Entfernung des für *E. coli* toxischen Lösungsmittel DMF, wurde die Platte 30-60 min unter der Sterilbank ausgedampft. Auf die ausgedampfte Agar-Platten wurde anschließend ein kompletter *E. coli* Transformationsansatz ausplattiert, angetrocknet und die Zellen über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.6.12 Transformation von *A. nidulans* TN02A7 durch Protoplastierung

Folgende Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Von 10 bis 12 gut sporulierenden Platten des Pilzes *A. nidulans* TN02A7 wurde eine Sporensuspension hergestellt (Kapitel 3.5.3). Hierbei wurde das Pellet in 1 ml GMM-Flüssigmedium mit Auxotrophiemarkern resuspendiert und in einen sterilen 500 ml Erlmeyerkolben mit 100 ml GMM-Medium Auxotrophiemarkern überführt. Nach der Inkubation über Nacht bei 30 °C und 130 rpm für ca. 12 bis 13 h wurde die Keimung der Übernachtskultur via Mikroskop kontrolliert. Waren die Keimschläuche circa 2-3 mal so lang wie der Conidiendurchmesser wurde die Zellkultur in 50 ml Reaktionsgefäßen bei 3000 rpm und 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet durch 2maliges Waschen mit 50 ml sterilem Aqua dest. gesäubert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml Osmotischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension erneut mikroskopiert. Nach der Zugabe von

Lysing Enzym (ca. 100 mg pro 1 g Conidien-Pellet) wurde die gesamte Protoplastensuspension in einen sterilen 250 ml Erlmeyerkolben gegeben und bei 30 °C und 80 rpm für ca. 3 Stunden inkubiert. Dabei wurde die Protoplastenkonzentration im 30 min-Takt mittels Mikroskop überprüft. Anschließend wurde die gesamte Protoplastensuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit 4 ml Trapping-Puffer überschichtet (Tab.3-19). Nach Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 15 Minuten wurde die trübe Protoplasten-Zwischenschicht mit abgeschnittenen Spitzen abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Daraufhin erfolgte die Zugabe des 2-2,5-fachen Volumens an STC-Puffer und eine erneuter Zentrifugationsschritt. Das Protoplastenpellet wurde vorsichtig in 1 ml STC-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C für 20 Sekunden wurden die Protoplasten in 100 µl STC-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Plasmid-DNA (ca. 10 µg) wurde mit Hilfe von 80 µl STC-Puffer verdünnt und mit 100 µl Protoplasten-Suspension vorsichtig gemischt. Nach der Inkubation auf Eis für 50 Minuten wurden 1,25 ml frisch angesetzter CaCl₂-PEG-Lösung (Tab.3-19) hinzugegeben und nach Inversion bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 5 ml STC-Puffer und die Lagerung auf Eis. Auf eine Platte Bottom Medium wurden je 600 µl Transformationsansatz ausplattiert und sofort mit 5 ml 40 °C warmem Top Agar überschichtet. Als Negativkontrolle wurde Wasser zu den Protoplasten gegeben und ein Transformationsansatz auf Medium ohne Selektionsmarker gegeben. Die Regeneration der Protoplasten fand bei 37 °C für 3 bis 6 Tage statt.

3.7 Methoden der Biochemie

3.7.1 Heterologe Genexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Eine 100 ml LB-Vorkultur wurde mit dem benötigten Antibiotikum versetzt und mit 10 µl einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und unter Schütteln bei 220 rpm über Nacht. Am nächsten Tag wurden 100 ml bzw. 1000 ml frisches Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 2 ml bzw. 20 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C mit 220 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 erfolgte die Induktion der Genexpression mit verschiedenen Konzentrationen an IPTG bei verschiedenen Temperaturen für unterschiedliche Zeiten. Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000 x g, 8 min, 4 °C) pelletiert und entweder direkt in 7 ml Lysepuffer resuspendiert oder bei -20 °C eingefroren

(Rohextrakt-Gewinnung). Der Zellsuspension wurde Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) zugeführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Zellen durch Ultraschall mit 6 Zyklen für je 10 s bei 200 bis 300 W (Branson Sonifier 250) bei 4 °C. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand (lösliche Proteinanteile) von den pelletierten, unlöslichen Bestandteilen abgenommen und das überproduzierte Protein anschließend mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 3.7.2) aus dem Lysat aufgereinigt.

3.7.2 Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose

Das Lysat der aufgeschlossenen Zellen wurde mit einer definierten Menge an Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) versetzt und auf Eis bei 4 °C für 1 h gemischt. Es wurden 25 µl Ni-NTA-Agarose für das Lysat aus 100 ml Zellkultur bzw. 150 bis 500 µl für Lysat aus 1000 ml Zellkultur verwendet. Anschließend wurde die Suspension auf einen leeren Säulenkörper mit Fritte überführt und die Säule zweimal mit 4 bzw. 8 ml Waschpuffer (Kapitel 3.3.3.4) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 500 µl bzw. 2,5 ml Elutionspuffer. Zum Entsalzen wurde die Elutionsfraktion auf eine mit Proteinlagerungspuffer äquilibrierte NAP5- oder PD10-Säule gegeben und mit insgesamt 1 ml bzw. 3,5 ml Proteinlagerungspuffer eluiert. Von der aufgereinigten Proteinfraction wurden Aliquots hergestellt und bei –80 °C gelagert. Während der gesamten Aufreinigung wurden von verschiedenen Aufreinigungsschritten Proben entnommen und diese mittels *Sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Kapitel 3.7.3) für eine Konzentrationsbestimmung überprüft.

3.7.2.1 Rohextrakt-Herstellung

Zur Gewinnung des Rohextraktes nach der Expression von EAW25547-His₆ wurden die eingefrorenen Zellpellets aufgetaut und in 1 ml Lysepuffer pro 1 g Feuchtgewicht resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen mit einem Sonifier (Branson Sonifier 250) sechs Mal je 10 s lang bei 200-300 W aufgeschlossen.

3.7.2.2 Zellextrakt-Gewinnung

Der Rohextrakt (3.7.2.1) aus 1 Liter Zellkultur wurde durch Zentrifugation bei 14000 x g für 30 min bei 4 °C von Zelltrümmern getrennt und über eine Sephadex G-25 PD-10 Säule von niedermolekularen Substanzen gereinigt und in Proteinlagerungspuffer (Kapitel 3.3.3.4) mit pH 7,5 umgepuffert. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80 °C.

3.7.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurde die Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Die notwendigen Puffer und Lösungen sind in Tabelle 3-17 (Kapitel 3.3.3.5) aufgeführt. Das 12%-ige Trenngel wurde mit einem 4 %-igen Sammelgel überschichtet. Die Zusammensetzung der einzelnen Gele ist in Tab. 3-17 (Kapitel 3.3.3.5) dargestellt. Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis von 5:1 mit $5 \times$ Protein-Probenpuffer gemischt. Der low molecular weight SDS marker (GE Healthcare) wurde als Proteingrößenstandard verwendet und zuvor den Herstellerangaben entsprechend vorbereitet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben und der Proteingrößenstandard für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 60 min mit einer Spannung von 180 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Das SDS-Gel wurde bis zum gewünschten Entfärbungsgrad für 1 bis 2 Stunden in der Entfärbelösung (Kapitel 3.3.3.5) inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen.

3.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford gewählt (Bradford 1976). Im ersten Arbeitsschritt wurde eine Kalibrierungsgerade mit einer 1 mg/ml *bovine serum albumin*-Lösung (BSA) erstellt. Hierfür wurden 1 bis 10 µg BSA mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml $1 \times$ Bradford-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der einzelnen Verdünnungen mit einem UV-Spektrometer bei 595 nm gemessen. Für jede Verdünnung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, aus deren Mittelwerten eine Kalibrierungsgerade erstellt wurde. Die zu bestimmende Probe wurde vor der Verwendung mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 auf ein Volumen von 100 µl gebracht und anschließend mit 1 ml $1 \times$ Bradford Reagenz gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption ebenfalls bei 595 nm gemessen. Über die vorher erstellte BSA-Kalibrierungsgerade konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.7.5 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Zur Bestimmung der nativen Molekulargewichte aufgereinigter, überproduzierter Proteine wurde eine Größenausschlusschromatographie mit der ÄKTAprimeTM plus Anlage der Firma GE Healthcare (Freiburg) durchgeführt. Die eingesetzte HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule wurde zuvor mit FPLC-Puffer (Kapitel 3.3.3.6: Tab. 3-18) bei 4 °C äquiliibriert. Die Visualisierung der Absorption bei 280 nm erfolgte mit dem Rekorder LKB Bromma 2210 (2-Channel Recorder). Die Anlage wurde stets bei einer Temperatur von 4 °C und einer Flussrate von 1 ml/min betrieben. Die verwendeten Fließmittel wurden vor der Verwendung filtriert (Porengröße 0,2 µM) und entgast. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa).

3.7.6 Enzymatische Reaktionsansätze

3.7.6.1 BrePT-Aktivitätsassays

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM CaCl₂, 1 mM des jeweiligen Substrats (zyklische Dipeptide), 1 mM DMAPP und 15 µg His₅-BrePT. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Die Ansätze wurden mit 1 Vol. Methanol abgestoppt, 20 min bei 14000 × g und 4 °C zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Als Kontrolle dienten die Ansätze mit hitzeinaktiviertem His₅-BrePT. Hierfür wurde das Protein für 30 min bei 100 °C erhitzt.

3.7.6.2 CdpC2PT-Aktivitätsassays

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 5 mM CaCl₂ und 1 mM DMAPP und wurde mit 20 µg CdpC2PT-His₆ durchgeführt. Als Substrate wurden 1 mM diverser zyklischer Dipeptide eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Das Abstoppen der Reaktionsansätze erfolgte durch die Lagerung auf Eis und die Zugabe mit 1 Vol. Methanol. Nach der Zentrifugation für 20 min bei 14000 × g und 4 °C erfolgte die Analyse mittels HPLC. Als Standard diente ein Gemisch aus 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mM des jeweils eingesetzten Substrates, sowie die Reaktionsansätze mit hitzeinaktiviertem CdpC2PT-His₆. Dazu wurde das Protein für 30 min bei 100 °C erhitzt. Für die Ionenabhängigkeit wurden jeweils 5 mM des entsprechenden Metallions bzw. EDTA zugegeben und die Ansätze mit (S)-Benzodiazepindion für 16 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten ein Standardansatz mit

Zugabe von 5 mM EDTA und ein Ansatz ohne Zusatz. Für die Abhängigkeit der Zeit wurde der Standardansatz mit 10 µg CdpC2PT-His₆ angesetzt und für 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 und 960 min bei 37 °C inkubiert. Für die Abhängigkeit der Proteinmenge wurden 1, 2, 5, 10, 20 und 40 µg CdpC2PT-His₆ verwendet und die Ansätze für 60 min inkubiert. Für die Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten (K_M -Wert) enthielten die Ansätze 10 µg CdpC2PT-His₆, 5 mM CaCl₂, 5 mM DMAPP und jeweils 0,010, 0,025, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500, 1, 2, und 5 mM von (*S*)-Benzodiazepindion, cyclo-L-Trp-L-Trp, cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp, cyclo-L-Trp-L-Leu, cyclo-L-Trp-L-Ala oder cyclo-L-Trp-L-Phe. Für die Abhängigkeit von DMAPP wurden 1 mM (*S*)-Benzodiazepindion, 10 µg CdpC2PT-His₆, 5 mM CaCl₂ und DMAPP mit Endkonzentrationen von 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, und 2,0 mM verwendet. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37 °C.

3.7.6.3 FtmPT3-Aktivitätsassays

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 5 mM CaCl₂ und 1 mM DMAPP und wurde mit 10 µg His₈-FtmPT3 durchgeführt. Als Substrate wurden 1 mM Verruculogen, Fumitremorgin B, 12, 13 Dihydroxyfumitremorgin C, Verruculogen TR-2 und Fumitremorgin C eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Das Abstoppen der Reaktionsansätze erfolgte durch die Lagerung auf Eis und die Zugabe mit 1 Vol. Methanol. Nach der Zentrifugation für 20 min bei 14000 × g und 4 °C erfolgte die Analyse mittels HPLC. Als Standard diente ein Gemisch aus 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mM des jeweils eingesetzten Substrates, sowie die Reaktionsansätze mit hitzeinaktiviertem His₈-FtmPT3. Dazu wurde das Protein für 30 min bei 100 °C erhitzt. Für die Ionenabhängigkeit wurden jeweils 5 mM des entsprechenden Metallions bzw. EDTA zugegeben und die Ansätze mit Verruculogen für 16 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten ein Standardansatz mit Zugabe von 5 mM EDTA und ein Ansatz ohne Zusatz. Für die Abhängigkeit der Zeit wurde der Standardansatz mit 10 µg His₈-FtmPT3 angesetzt und für 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 und 960 min bei 37 °C inkubiert. Für die Abhängigkeit der Proteinmenge wurden 1, 2, 5, 10, 20 und 40 µg His₈-FtmPT3 verwendet und die Ansätze für 60 min inkubiert. Für die Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten (K_M -Wert) enthielten die Ansätze 10 µg His₈-FtmPT3, 2 mM DMAPP, 5 mM CaCl₂ und jeweils 0,002, 0,005, 0,010, 0,025, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500, 1 und 2 mM von Verruculogen, Fumitremorgin B, 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C und Verruculogen TR-2. Für die Abhängigkeit von DMAPP wurden 1 mM Verruculogen, 10 µg His₈-FtmPT3, 5 mM CaCl₂ und DMAPP mit Endkonzentrationen von 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 oder 5,0 mM verwendet. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37 °C.

3.7.6.4 Reaktionsansätze mit den putativen Prenyltransferasen EAW21072-His₆ und EAW09999-His₆

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM CaCl₂, 1 mM des jeweiligen Substrats, 1 mM DMAPP, 1 mM GPP oder 1 mM FPP und 20 µg von EAW21072-His₆ oder EAW09999-His₆. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Die Ansätze wurden mit 1 Vol. Methanol abgestoppt, 20 min bei 14000 × g und 4 °C zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Als Kontrolle diente entweder ein Gemisch aus 1 mM des entsprechenden Substrats in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) oder ein Ansatz mit hitzeinaktiviertem Protein. Hierfür wurde das Protein für 30 min bei 100 °C erhitzt.

3.7.6.5 Reaktionsansätze mit der putativen Aminooxidase EAW25547-His₆

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 1 mM cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp oder cyclo-bis-(L-2-tert-prenyl-Trp) und 1 mM FMN/und oder 1 mM FAD/und oder NADH/und oder 1 mM NADPH. Der Ansatz wurde bis zu einem Endvolumen von 100 µl mit der aufgereinigten Elutionsfraktion aufgefüllt. Der Standardansatz für eine Koinkubation mit CdpC2PT-His₆ enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM cyclo-L-Trp-L-Trp, 5 mM CaCl₂, 1 mM DMAPP, 1 mM FMN/und oder FAD, 1 mM NADH/und oder NADPH, 10 µg CdpC2PT-His₆ und 20 µl von der aufgereinigten Elutionsfraktion von EAW25547-His₆. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetatphasen wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und nach Resuspension des Rückstands in 100 µl Methanol mittels HPLC analysiert.

3.7.6.6 Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte mit CdpC2PT-His₆

Für die Isolierung der enzymatischen Produkte zur Strukturaufklärung wurde jeweils ein 20 ml Ansatz mit 4 mg CdpC2PT-His₆, 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl₂ in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 400 µl Methanol aufgenommen und die verschiedenen Produkte mittels HPLC isoliert.

3.7.6.7 Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte mit His₈-FtmPT3

Zur Isolierung der enzymatischen Produkte von His₈-FtmPT3 zur Strukturaufklärung wurde jeweils ein 20 ml Ansatz mit 4 mg His₈-FtmPT3, 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl₂ in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei einer Wasserbadtemperatur von 30 °C bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 400 µl Methanol aufgenommen und die Substanzen mittels HPLC isoliert.

3.8 Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten

3.8.1 Extraktion der Kulturüberstände von *A. nidulans* TN02A7 und Transformanten

Der *A. nidulans* Stamm TN02A7 und dessen Transformanten wurden zur Analyse von Sekundärmetaboliten in 100 ml AMM und CDH-Medium (Kapitel 3.3.1.2) bei 37 °C und unter Schütteln bei 130 rpm für 5 Tage unter Lichtausschluss kultiviert. Vor der Extraktion der Kulturüberstände wurde das Mycel über Glaswolle abgetrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Extraktion wurden die Überstände zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphasen vereinigt und zur Trockene eingengt. Das Pellet wurde in 1000 µl Methanol resuspendiert und mittels HPLC (Kapitel 3.9.1) analysiert.

3.9 Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen

3.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.9.1.1 Geräte und Säulen

Alle HPLC-Analysen innerhalb der vorliegenden Arbeit erfolgten an den 1200 Serien HPLC-Anlagen der Firma Agilent (Böblingen). Zu analytischen Zwecken wurde als Hauptsäule eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Hauptsäule wurde durch

eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) geschützt. Für die präparative Isolierung erfolgte die Trennung über eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) in Kombination mit einer Multoprep RP-18 gefüllten Vorsäule (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) bei einer Flussrate von 2,5 ml/min. Die Detektion erfolgte jeweils mit einem Photodioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 bzw. 277 nm. Die zur Trennung verwendeten Fließmittelkomponenten sind in Tab. 3-25 zusammengefasst.

Tab. 3-25: Fließmittel zur Trennung niedermolekularer Substanzen mittels HPLC.

Lösungsmittel	Fließmittel-Bestandteile
A	bidest. Wasser
B	bidest. Wasser + 0,5 % TFA
C	Methanol
D	Methanol + 0,5 % TFA
E	Acetonitril
F	Acetonitril+ 0,5 % TFA

3.9.1.2 Analytik der verschiedenen Reaktionsansätze

Die Analyse der verschiedenen Reaktionsansätze erfolgte mit einem Gradienten für eine bestimmte Zeit, einem 5-minütigen Waschschrift mit 100 % des Lösungsmittels C und 5 min Äquilibration auf das Anfangsverhältnis. Als Fließmittel dienten bidest. Wasser (Lösungsmittel A) und Methanol (Lösungsmittel C). Für die Analyse der enzymatischen Produkte von CdpC2PT-His₆ und His₈-FtmPT3 wurde ein linearer Gradient von 50 % auf 100 % Lösungsmittel C in 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet.

3.9.1.3 Isolierung der enzymatischen Produkte der verschiedenen Reaktionen

Die Isolierung der enzymatischen Produkte von CdpC2PT-His₆ und His₈-FtmPT3 erfolgte auf einer präparativen Säule mit dem gleichen Programm, das für die analytische Säule verwendet wurde. Eine Flussrate von 2,5 ml/min wurde verwendet. Die Produktpeaks wurden isoliert und bis zur Trockene eingengt.

3.9.1.4 Analytik der Extrakte von *A. nidulans* TN02A7 und Transformanten

Für die Analyse der Extrakte von *A. nidulans* TN02A7 und dessen Transformanten wurde vorwiegend ein linearer Gradient von 10 % auf 100 % Lösungsmittel D (Methanol + 0,5 % TFA) in 40 min in Lösungsmittel B (bidest. Wasser + 0,5 % TFA) verwendet. Für die eingesetzte Multospher RP-18-Säule wurde eine Flussrate von 1 ml/min genutzt.

Zur Analyse der Sekundärmetabolite von *A. nidulans* TN02A7 mit *Pc21g15480* wurde das gleiche Programm verwendet, jedoch die Lösungsmittel B (bidest. Wasser + 0,5 % TFA) und F (Acetonitril + 0,5 % Acetonitril).

3.9.1.5 Isolierung aus den Transformanten von *A. nidulans* TN02A7

Die Isolierung der Extrakte von *A. nidulans* TN02A7 erfolgte mit einem linearen Gradient von 10 % auf 100 % Lösungsmittel E (Acetonitril) in Lösungsmittel A (bidest. Wasser) in 40 min. Eine Flussrate von 2,5 ml/min wurde verwendet. Die Produktpeaks wurden isoliert und bis zur Trockene eingeeengt.

3.9.2 Massenspektrometrie (MS)

Die Messungen der hochauflösenden Elektrospray-Ionisation-Spektren (HR-ESI-Spektren) von den enzymatischen Produkten von FtmPT3 (Kapitel 7: Abb.7-5 - Abb.7-8), sowie die Messungen der hochauflösenden Elektronenstoß-Ionisation-Spektren (HR-EI-Spektren) der enzymatischen Produkte von CdpC2PT (Kapitel 7: Abb.7-11 - Abb.7-16) erfolgten durch Dr. Laufenberg und Frau Zitzer an einem AutoSpec-Gerät der Firma Micromass Co. UK Ltd (jetzt Bruker).

3.9.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung mittels NMR-spektroskopischer Analysen wurden die Proben über Nacht im Gefriertrockner getrocknet und in deuteriertem Lösungsmittel (Eurisotop) aufgenommen. Das Lösungsmittelsignal diente auch zur Kalibrierung der chemischen Verschiebungen. Die NMR-Daten wurden mit der Software MestReNova (MestreLab Research, S.L., Santiago de Compostela) ausgewertet. Die NMR-Messungen durch Herrn Dr. Kämpchen und Herrn Newel erfolgten an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, München). Die zu analysierenden Proben wurden in CDCl₃, CD₃OD oder DMSO-d₆ aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus Ascomyceten

4.1.1 Einleitung

Im letzten Jahrzehnt konnte durch vergleichende Genomsequenz-Analysen der Pilze *A. fumigatus* Af293, A1163 und deren naher Verwandter *N. fischeri* NRRL181, ein Gencluster für die Biosynthese von Verruculogen identifiziert werden. Dieses Gencluster befindet sich auf dem 8. Chromosom in *A. fumigatus* Af293 und umfasst insgesamt 10 Gene mit einer Gesamtgröße von 25 kb (bp 747,862 – 772,825 in der Sequenz mit der GenBank Accession Nr. AAHF01000014) (Li 2011). Die Gene des Clusters zeigen hohe Sequenzidentitäten von 68 bis 100 % auf Aminosäureebene zueinander auf. Durch den Vergleich der Gencluster von allen drei Pilzstämmen, ist jedoch anzunehmen das *ftmP* und *ftmO* von *N. fischeri* vermutlich nicht zum eigentlichen Cluster gehören. Aufgrund des fehlenden Gens codierend für eine mögliche Verruculogen-Prenyltransferase, wurde bis zu Beginn dieser Arbeit gemutmaßt, dass Verruculogen das Endprodukt des Biosyntheseweges ist.

Durch vorherige Kulturexperimente von *N. fischeri* NRRL181 konnte bereits Acetylaszonalenin in unserer Arbeitsgruppe isoliert werden (Yin *et al.*, 2009b). In diesem HPLC Chromatogram konnte kürzlich durch Frau Beate Wollinsky Verruculogen und Fumitremorgin A und somit indirekt das genetische Potential von *N. fischeri* NRRL181 für eine Verruculogen-Prenyltransferase nachgewiesen werden. Untersuchungen der Genomsequenz von *N. fischeri* NRRL181 zeigten das Vorhandensein von 10 putativen Prenyltransferase-Genen der DMATS Superfamilie (Khaldi *et al.*, 2010). Durch biochemische Untersuchungen mit rekombinanten Enzymen aus *N. fischeri* oder deren Orthologe von anderen Pilzen, konnte die Funktion von sieben putativen Prenyltransferasegenen bestimmt werden. Dies umfasst auch zwei Gene aus dem Biosynthese-Gencluster für Fumitremorgin/Verruculogen: *NFIA_093720* und *NFIA_093760*. *NFIA_055300* (AnaPT) ist ein Mitglied des Acetylaszonalenin-Genclusters (Yin *et al.*, 2009b), *Af8g00620* und *NFIA_074280* codieren für CdpNPT und CdpC3PT (Yin *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2010). Weiterhin konnten 7-DMATS von *A. fumigatus* Af293, welches die C7 Prenylierung von L-Tryptophan katalysiert und NscD von *N. fischeri* aus der Neosartoricin-Biosynthese aufgeklärt werden (Chooi *et al.*, 2013; Kremer *et al.*, 2007). Ein Vergleich der vorhergesagten mit den bereits identifizierten Prenyltransferase-Genen, resultierte in drei Genen von *N. fischeri* NRRL181 mit noch unbekannter Funktion (*NFIA_093400*, *NFIA_043650* und *NFIA_062330*).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Gene *NFIA_093400* (*ftmPT3*), *NFIA_043650* (*cdpC2PT*) und *NFIA_062330* heterolog in dem Expressionswirt *E. coli* zu exprimieren, die rekombinanten Proteine zu isolieren und die jeweilige Funktion biochemisch zu charakterisieren.

4.1.2 Charakterisierung der Prenyltransferase FtmPT3 aus *N. fischeri*

4.1.2.1 Sequenzanalysen von *ftmPT3*

Das Gen *NFIA_093400* (im weiteren Verlauf als *ftmPT3* bezeichnet), codierend für eine putative Prenyltransferase aus der DMATS Superfamilie, aus *N. fischeri* NRRL181 besteht aus zwei Exons mit einer Länge von 1251 bp und 112 bp, die durch ein Intron mit einer Länge von 62 bp unterbrochen werden. Durch den Sequenzvergleich mit Aminosäure-Sequenzen von bereits charakterisierten Prenyltransferasen (Anhang 7.1.1) und unter der Nutzung des Programmes FGENESH, konnte die enthaltene Intronsequenz festgestellt werden. Analysen der Genomsequenz von *N. fischeri* NRRL181 konnten die Lokalisation des Gens *NFIA_093400* auf dem Contig 580 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. AAKE03000020.1) nachweisen. Das abgeleitete Genprodukt FtmPT3 (EAW19377) umfasst 453 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 51,6 kDa. FtmPT3 weist keine signifikanten Sequenzidentitäten zu anderen Prenyltransferasen in Pilzen auf. Aber es konnten Identitäten von maximal 35 % mit CdpC3PT aus *N. fischeri* NRRL181 (Yin *et al.*, 2010), 33 % mit 5-DMATS aus *A. clavatus* NRRL1 (Yu *et al.*, 2012), 32 % mit CdpNPT aus *A. fumigatus* B5233 (Yin *et al.*, 2007) und 30 % mit FtmPT2 aus *A. fumigatus* Af293 (Grundmann *et al.*, 2008) auf Aminosäureebene festgestellt werden. Ein Alignment mit dem gesamten Contig AAKE03000020.1 auf der Nukleotidebene, zeigte hohe Übereinstimmungen mit dem 2. Chromosom von *A. fumigatus* Af293. Dies legt die Vermutung nahe, dass *ftmPT3* aus *N. fischeri* NRRL181 im Genom auf dem 2. Chromosom lokalisiert ist (Abb. 4-1).

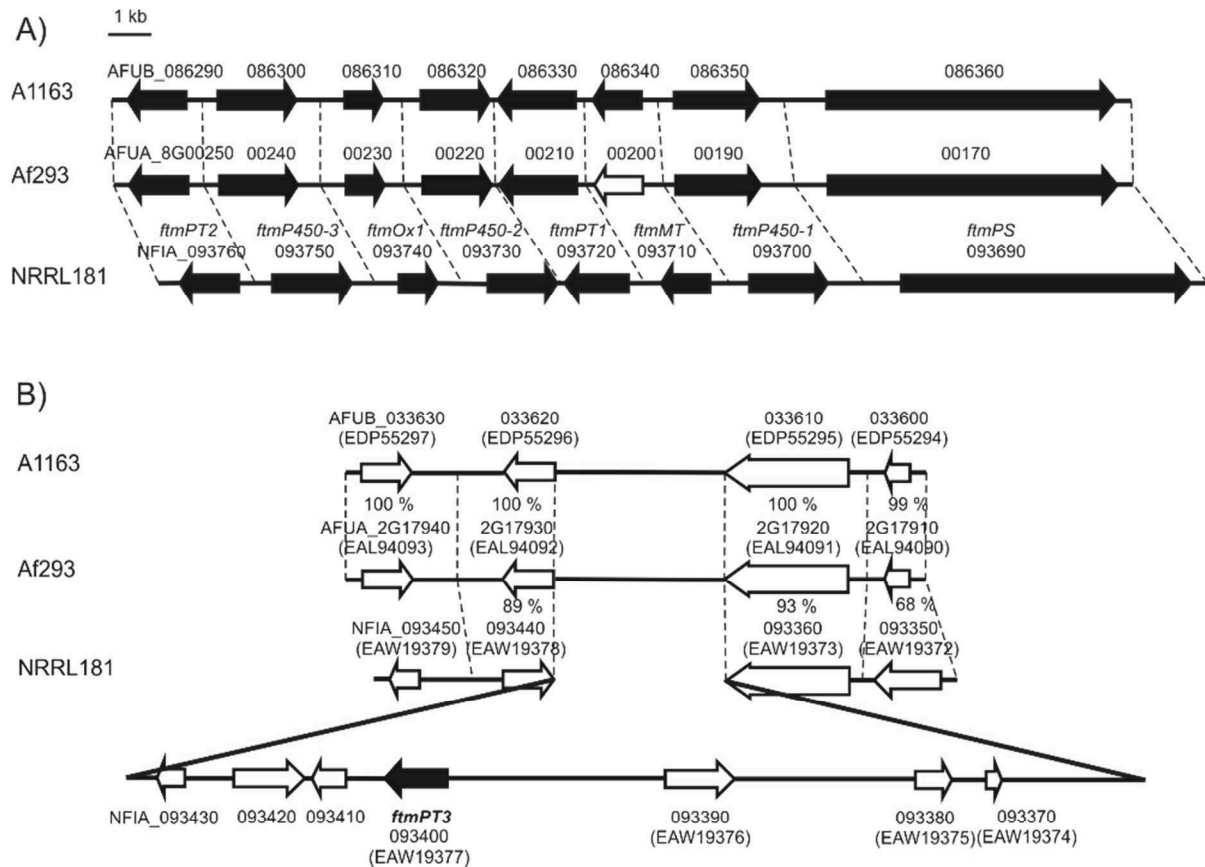


Abb. 4-1: Gencluster von Fumitremorgin-Typ Alkaloiden aus *A. fumigatus* Af293, A1163 und *N. fischeri* NRRL181. A) Gencluster für die Verruculogen-Biosynthese, B) putatives Gencluster mit *ftmPT3*. Gene mit hohen Sequenzähnlichkeiten sind mit gestrichelten Linien markiert. Schwarze Pfeile bezeichnen Gene oder deren Orthologe, deren Funktion experimentell bewiesen wurde.

4.1.2.2 Amplifikation von *ftmPT3* aus gDNA und cDNA von *N. fischeri* NRRL181

Das Gen *ftmPT3* wurde von gDNA aus *N. fischeri* NRRL181 mit Hilfe des High Fidelity PCR-Kits von Roche und durch Fusions-PCR (Kapitel 3.6.4) amplifiziert. Die Amplifikation des 1. Exons erfolgte durch die Primerkombination KM_093400-1/KM_093400-3 (Abb. 4-2 A: 1. Exon) und für das 2. Exon wurden die Primer KM_093400-2/KM_093400-4 (Abb. 4-2 A: 2. Exon) eingesetzt. Durch den Primer KM_093400-4 wurde das enthaltene Stopcodon für eine spätere Aufreinigung mittels Histidin-tag mutiert. Für die Fusion beider Exons wurde jeweils das PCR-Produkt 1 und das PCR-Produkt 2 als Template für die Primer KM_093400-1 und KM_093400-4 verwendet (Abb. 4-2 B: Fusion). Zur Bestätigung der Intron-Vorhersage erfolgte ebenfalls die Amplifikation von cDNA mittels der Primerkombination KM_093400-1 und KM_093400-4 und die anschließende Sequenzierung des resultierenden Klonierungskonstruktes (Abb. 4-2 C: cDNA). Wie auf dem Agarosegel in Abb. 4-2 zu beobachten, war die Amplifikation von gDNA und cDNA erfolgreich.

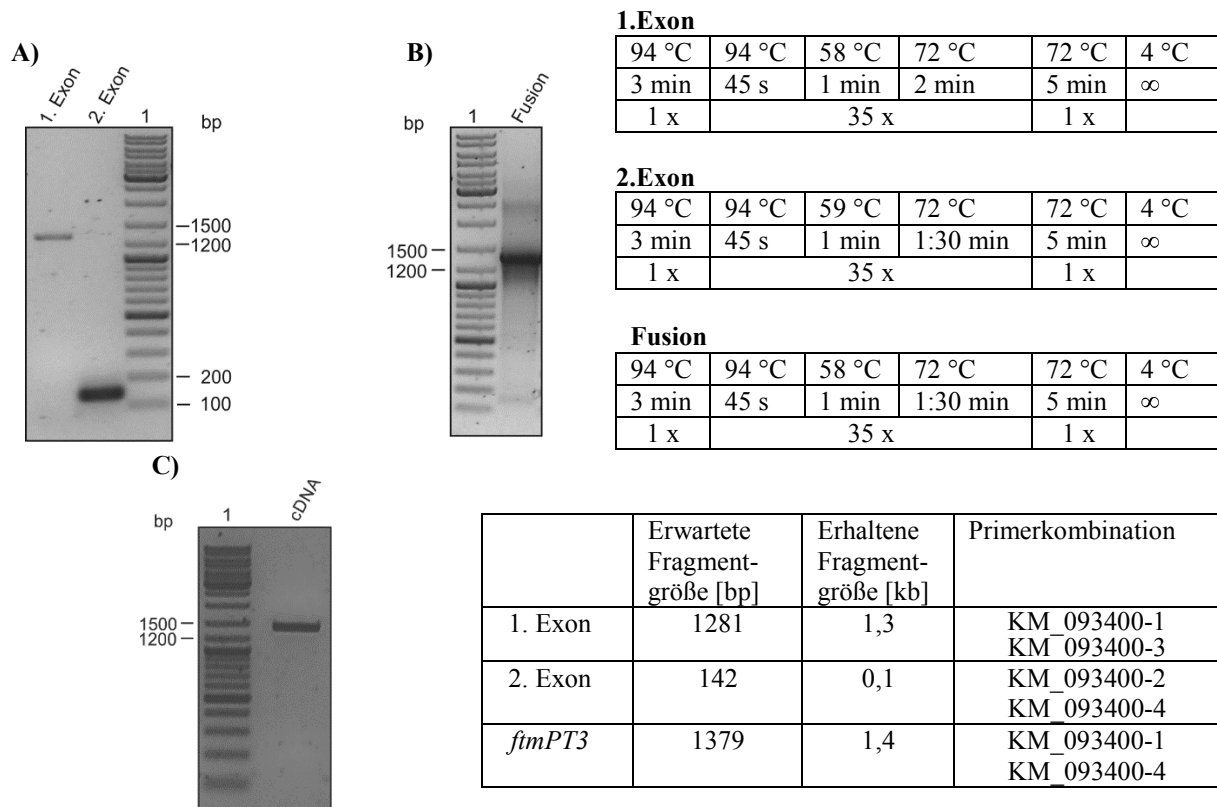
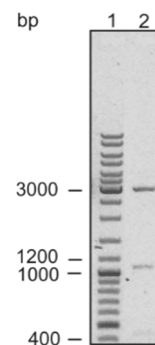
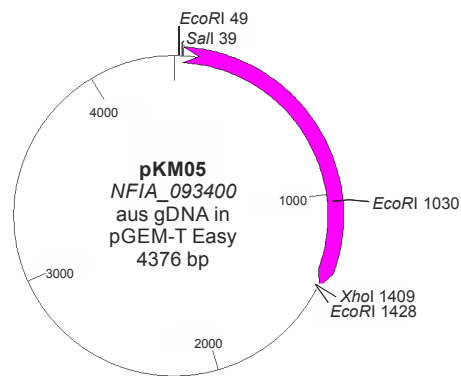


Abb. 4-2: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *ftmPT3* aus gDNA und cDNA. A): Amplifikation der Exons 1 und 2 aus gDNA, B): Fusion Exon 1 und 2 aus gDNA, C): Amplifikation aus cDNA; Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

4.1.2.3 Klonierung und Transformation

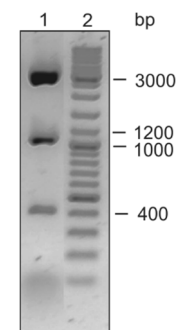
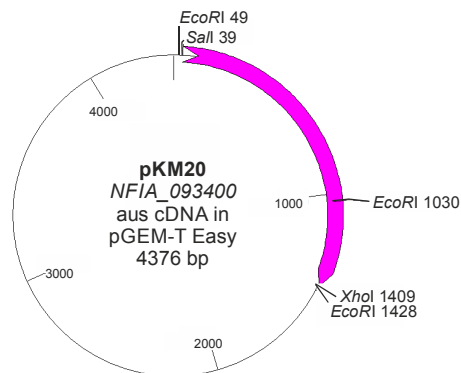
Die erfolgreich amplifizierten PCR-Fragmente wurden jeweils in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert und durch Hitzeschock in *E. coli* DH5 α eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und weiterkultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und mit Hilfe eines *EcoRI*-Verdaus analysiert (Abb. 4-3 A: Laufspur 2, Abb. 4-3 B: Laufspur 1). Durch eine Sequenzierung der Klonierungskonstrukte wurde die fehlerfreie Basensequenz von *fimPT3*, die vorhergesagte Intronsequenz und die gewünschte Mutation des Stopcodons in den Konstrukten pKM05 (gDNA) und pKM20 (cDNA) bestätigt.

A)



berechnete Fragmentgrößen:
EcoRI: 2997 bp + 981 bp + 398 bp

B)



berechnete Fragmentgrößen:
EcoRI: 2997 bp + 981 bp + 398 bp

Abb. 4-3: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung von A) pKM05 (*fimPT3* in pGEM-T Easy aus gDNA) und B) pKM20 (*fimPT3* in pGEM-T Easy aus cDNA) mit zugehörigen Vektorkarten. Dargestellt sind für die Überprüfung sowie für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Das Plasmid pKM05 wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *XhoI* geschnitten und das 1379 bp lange DNA-Fragment in den Expressionsvektor pHIS8 umkloniert, der zuvor mit

denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Das nach der Umklonierung erhaltene und mittels *EcoRI*-Verdaus kontrollierte Plasmid wurde als pKM08 bezeichnet (Abb. 4-4).

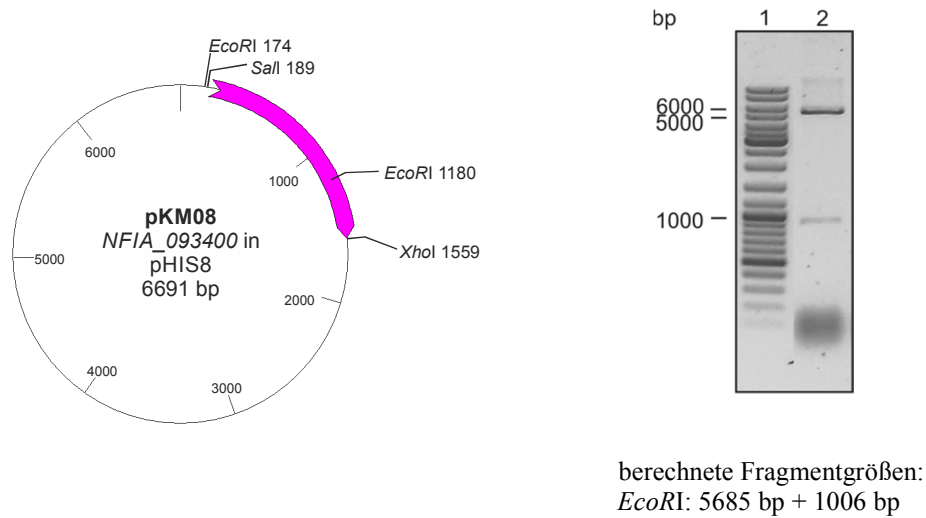


Abb. 4-4: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM08 (*ftmPT3* in pHIS8) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.1.2.4 Überproduktion und Reinigung von His₈-FtmPT3

Die Expression des Gens erfolgte in *E. coli* SoluBL21 Zellen nach der Induktion durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG bei 30 °C für 6 h in LB-Medium. Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnten 3 mg His₈-FtmPT3 aus einem Liter Kultur erhalten werden. Die gelelektrophoretische Analyse (Abb. 4-5) zeigte für das Protein unter denaturierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 53 kDa, das mit dem theoretischen Molekulargewicht von His₈-FtmPT3 von 52,7 kDa gut übereinstimmte.

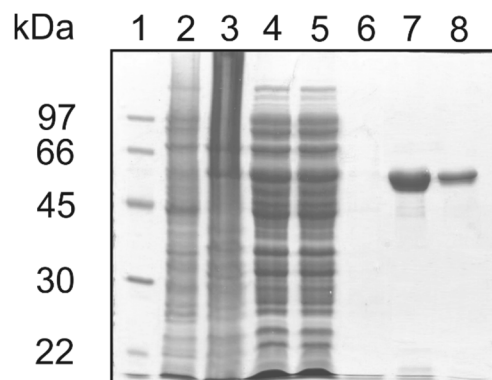


Abb. 4-5: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von His₈-FtmPT3 (pKM08) in *E. coli* SoluBL21 Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 6 h Induktion, Spur 4: löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1, Spur 8: Elutionsfraktion 2.

4.1.2.5 Aktivitätstest mit FtmPT3

Für den enzymatischen Aktivitätsnachweis von FtmPT3 wurde zunächst das vermutete natürliche Substrat Verruculogen in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ und 1 mM DMAPP in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C inkubiert.

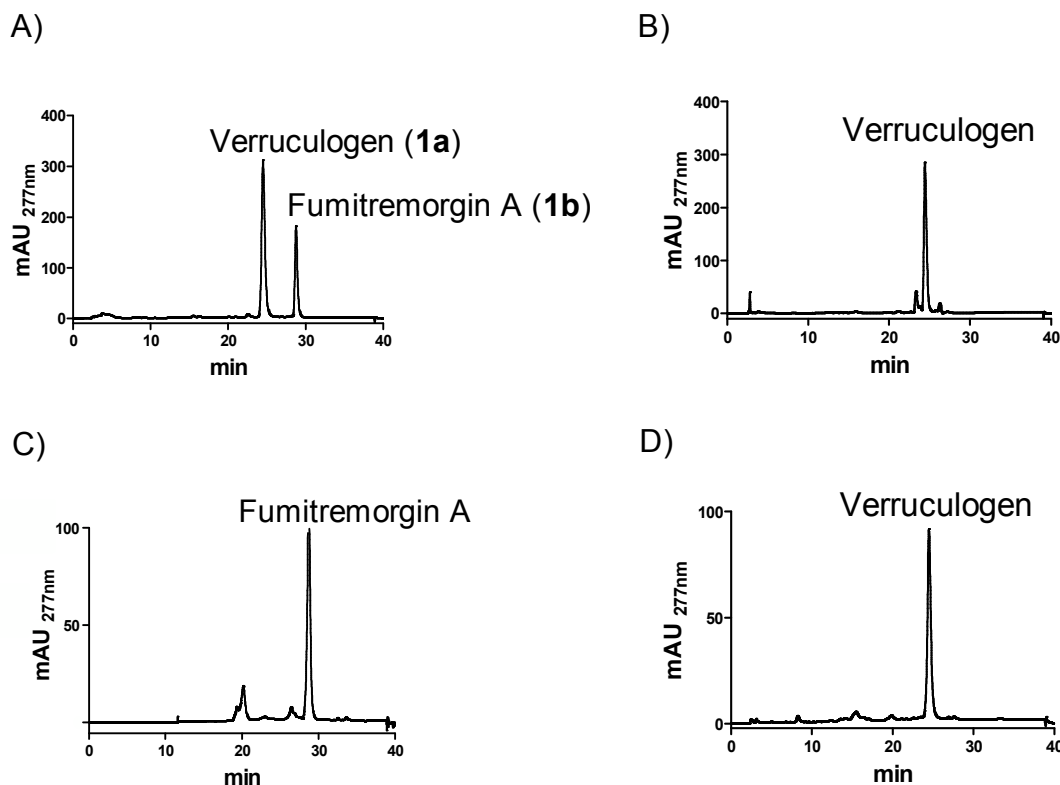


Abb. 4-6: HPLC-Chromatogramme zu der Umsetzung von Verruculogen (1a) zu Fumitremorgin A (1b). A) Reaktionsansatz mit Verruculogen und FtmPT3 in Anwesenheit von DMAPP, B) Reaktionsansatz mit Verruculogen und hitzeinaktivierten FtmPT3 in Anwesenheit von DMAPP, C) Fumitremorgin A Standard, D) Verruculogen Standard.

Die Inkubation von Verruculogen (1a) in Anwesenheit von 20 µg FtmPT3 und 1 mM DMAPP führte zur Bildung eines zusätzlichen Peaks (1b) mit einer Retentionszeit von 28,8 min (Abb. 4-6: A). Dieser neu entstandene Peak zeigte dieselbe Retentionszeit wie der Fumitremorgin A Standard (Abb. 4-6: C). Parallel dazu wurde eine Negativkontrolle mit hitzeinaktiviertem His₈-FtmPT3 unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Wie in dem HPLC-Chromatogram von Abb. 4-6: B zu sehen ist, konnte kein zusätzlicher Peak mit einer Retentionszeit von 28,8 min beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass FtmPT3 in Anwesenheit von DMAPP die enzymatische Umsetzung von Verruculogen (1a) zu Fumitremorgin A (1b) katalysiert.

Daraufhin wurden Fumitremorgin B, Fumitremorgin C und 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C, die freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Qiangun Gu aus Qingdao (China) zur Verfügung gestellt wurden, sowie Verruculogen TR-2, das von Frau Beate Wollinsky isoliert wurde, als Substrate getestet. Die Analyse der Reaktionsansätze nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte mittels HPLC (Abb. 4-7).

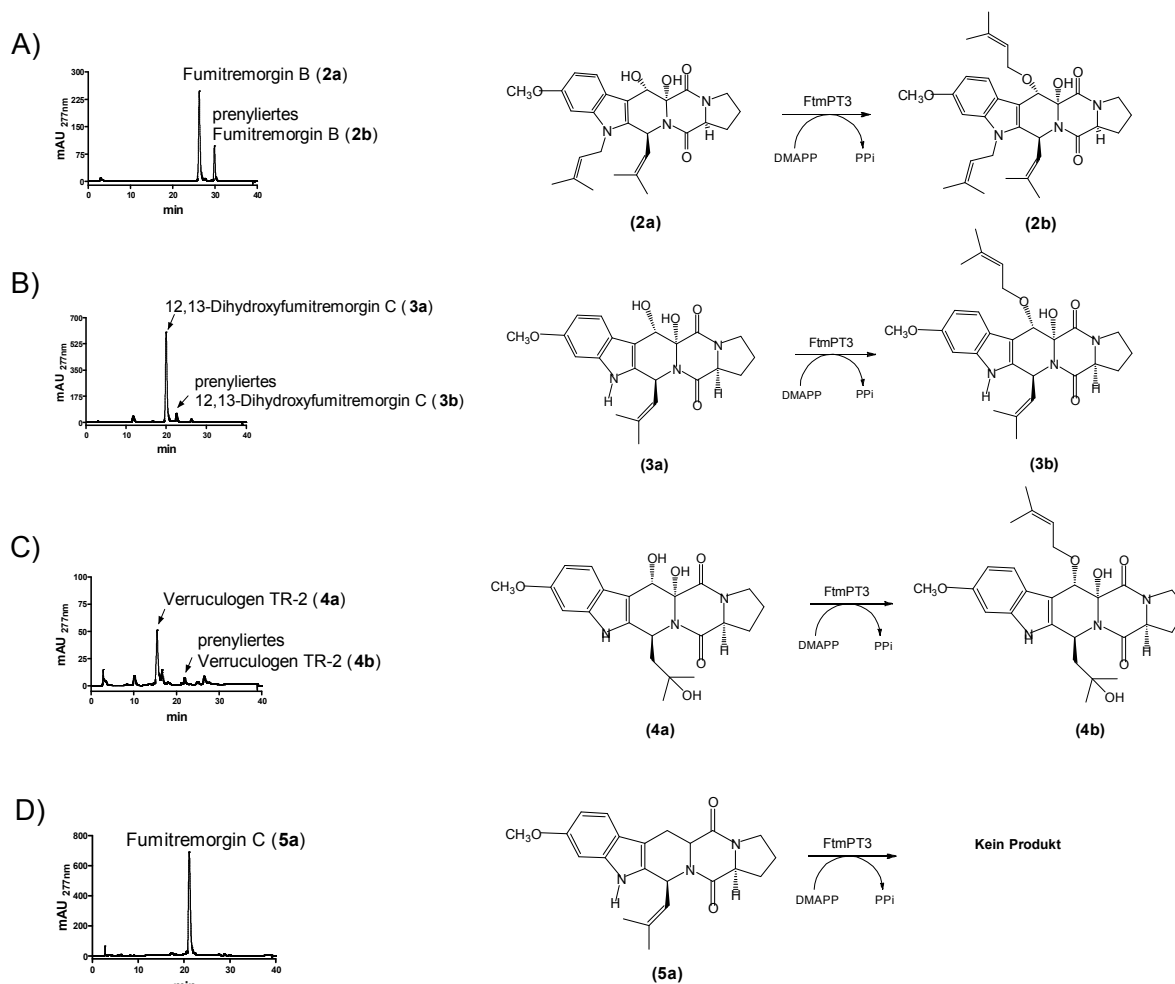


Abb. 4-7: HPLC-Chromatogramme der Enzymassays für den Aktivitätsnachweis von FtmPT3 in Anwesenheit von DMAPP. A) Fumitremorgin B (2a), B) 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C (3a), C) Verruculogen TR-2 (4a), D) Fumitremorgin C (5a). Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 20 µg His₈-FtmPT3, 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP und 5 mM CaCl₂.

Wie in Abbildung 4-7 zu sehen, akzeptierte FtmPT3 neben Fumitremorgin B insgesamt drei getestete Fumitremorgin-Typ Alkaloide, wobei alle akzeptierten Substrate durch die Anwesenheit einer Hydroxy-Gruppe an Position C-13 des Diketopiperazinrings gekennzeichnet waren. Substanzen, die keine OH-Gruppe an dieser Position aufwiesen, z.B. Fumitremorgin C (5a), konnten durch FtmPT3 nicht umgesetzt werden (Abb. 4-7: D). Durch FtmPT3 und der Anwesenheit von DMAPP konnte jeweils ein zusätzlicher Peak in den

Reaktionsansätzen mit Fumitremorgin B (**2a**); 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C (**3a**) und Verruculogen TR-2 (**4a**) festgestellt werden. Dabei zeigte FtmPT3 mit Umsetzungen von 24 % und 10 % eine höhere Affinität zu Fumitremorgin B und 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C als zu Verruculogen TR-2, welches nur zu 8 % umgesetzt wurde.

4.1.2.6 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte mit His₈-FtmPT3

Für die Isolierung der enzymatischen Produkte von Verruculogen (**1b**) und Fumitremorgin B (**2b**) wurde jeweils ein 10 ml Reaktionsansatz mit 2 mg His₈-FtmPT3, 1 mM DMAPP und 1 mM Substrat angesetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung der Produkte erfolgte mittels HPLC. Die Strukturen der Produkte wurden mit spektroskopischen Methoden (ESI-MS sowie ¹H-NMR) aufgeklärt (Tab. 4-1, Tab. 4-2). Die ¹H-NMR-Spektren der Produkte befinden sich im Anhang (Kapitel 7.2: Abb.7-9, Abb.7-10). Der Vergleich der ¹H-NMR-Spektren der enzymatischen Produkte Fumitremorgin A (**1b**) und dem prenylierten Fumitremorgin B (**2b**) mit den entsprechenden Substraten (**1a** und **2a**), zeigte die Signale für eine Dimethylallyl-Einheit bei δ_{H} 4,72-5,02 (dd, H-31), 4,67-4,74 (dd, H-31), 5,60-5,61 (br t, 1H-32) und 1,81 ppm (s, 6H-34/35). Diese Signale lassen eine reguläre Prenylierung vermuten. Zusätzlich dazu, konnte das Signal für das Proton OH-13 in allen ¹H-NMR-Spektren der isolierten enzymatischen Produkte von FtmPT3 nicht mehr aufgefunden werden. Nach der Prenylierung änderten sich andere Protonensignale des Indol-Diketopiperazinringsystems kaum, was darauf hindeutet, dass der Prenylrest an die Hydroxy-Gruppe OH-13 angeheftet wurde. Demzufolge konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass FtmPT3 die reguläre Prenylierung der Hydroxy-Gruppe an Position C-13 des Indol-Diketopiperazinringsystems katalysiert. Zudem stimmten die gemessenen NMR-Daten des isolierten Produktes Fumitremorgin A (**1b**) gut mit den schon zuvor publizierten Daten für Fumitremorgin A überein (Yamazaki *et al.*, 1979).

Tab. 4-1: ¹H-NMR-Daten der enzymatischen Produkte von FtmPT3 im Vergleich zu Literaturangaben.

Position	1b (Yamazaki <i>et al.</i> , 1979)	1b in CDCl ₃	2a (Grundmann <i>et al.</i> , 2008)	2b in CDCl ₃
	δ _H [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (J [Hz])
3	6,13 br d	6,12 d (10,3)	5,97 dd (10,0; 0,8)	6,05 dd (10,1; 0,8)
6	5,06 t	5,07 dd (7,1; 9,1)	4,45 dd (10,0; 7,0)	4,63 dd (7,5; 9,6)
7	1,60 – 2,20 m ^a 2,40 m ^b	1,60 – 2,20 m ^d 2,40 m ^c	2,48 m 2,10 m ^g	2,42 m 2,14 m ^h
8	1,60 – 2,20 m ^a 2,40 m ^b	1,60 – 2,20 m ^d 2,40 m ^c	2,10 m ^g 1,98 m	2,14 m ^h 2,03 m
9	3,63 m	3,62 m	3,64 dd (9,0; 4,5)	3,62 m
OH-12	4,48 s	4,46 s	3,99 s	4,42 s
OH-13			4,70 d (2,6)	
13	5,50 s	5,49 d (0,9)	5,77 dd (2,6; 0,8)	5,57 d 0,8
16	7,68 d	7,68 d (8,6)	7,85 d (8,7)	7,65 d 8,7
17	6,82 q	6,83 dd (8,8; 2,3)	6,80 dd (8,7; 2,3)	6,80 dd (8,7; 2,3)
19	6,59 d	6,59 d (2,2)	6,70 d (2,3)	6,69 d 2,2
21	6,62 d	6,63 d (8,1)	4,54 m	4,53 t 5,5
22	5,02 br d	5,01 br d (8,3)	5,04 td (6,4; 1,0)	5,02 td (8,7; 6,2)
24	1,71 s	1,71 s	1,85 d (1,0)	1,84 s
25	1,71 s	1,71 s	1,70 d (1,0)	1,68 d (1,3)
26	1,60 – 2,20 m ^a 2,40 m ^b	1,60 – 2,20 m ^d 2,40 m ^b	4,71 dm (10,0)	4,67 dm (10,1)
28	2,00 s	1,99 d (1,3)	1,99 d (1,2)	1,97 d (1,2)
29	0,99 s	1,0 s	1,63 d (1,2)	1,61 d (1,2)
30	3,84 s	3,84 s	3,84 s	3,84 s
31	4,71 br q	4,72 dd (10,3; 6,9) 4,67 dd (9,1; 7,5)	-	5,02 dd (8,7; 6,2) 4,74 dd (7,0; 11,0)
32	5,60 br t	5,60 br t (7,0)	-	5,61 br t (1,4)
34	1,81 s ^c	1,81 s ^f	-	1,81 d (1,2) ⁱ
35	1,81 s ^c	1,81 s ^f	-	1,81 d (1,2) ⁱ

^{a-i}: Signale mit gleichen Buchstaben überlappen

Die Massen aller enzymatischen Produkte von FtmPT3 (**1b**, **2b**, **3b** und **4b**) wurden zusätzlich durch HR-ESI-MS bestätigt (Tab. 4-2, Kapitel 7.2: Abb.7-5 - Abb.7-8).

Tab. 4-2: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Produkte von FtmPT3

Isolierte Produkte von FtmPT3	Summenformel	HR-ESI-MS Daten		Abweichung (ppm)
		Berechnet	Gemessen	
1b	C ₃₂ H ₄₂ N ₃ O ₇	602,2842 [M + Na] ⁺	602,2833	-1,5
2b	C ₃₂ H ₄₁ N ₃ O ₅	546,2967 [M + H] ⁺	546,3005	6,9
3b	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₅	502,2317 [M + Na] ⁺	502,2349	6,4
4b	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₆	498,2604 [M + H] ⁺	498,2561	-8,6

4.1.2.7 Biochemische Eigenschaften von His₈-FtmPT3 und Bestimmung der kinetischen Parameter

Mittels Größenausschlusschromatographie konnte das Molekulargewicht von His₈-FtmPT3 in seinem nativen Zustand als 268 kDa bestimmt werden. Das weist darauf hin, dass das Protein in seiner aktiven Form als Homopentamer vorliegt. Die Produktbildung bei einem 100 µl Reaktionsansatz befindet sich mit 10 µg Protein bzw. 60 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abb. 4-8)

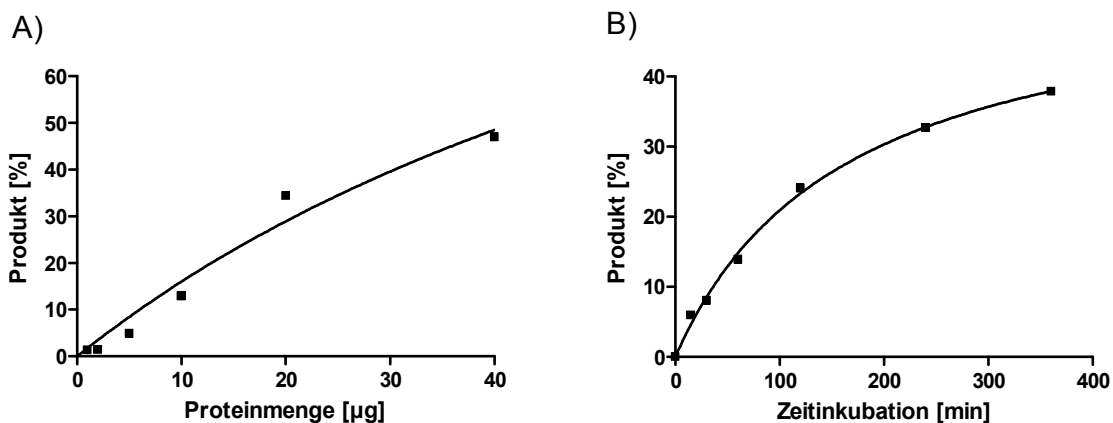


Abb. 4-8: Abhängigkeit der Produktbildung der FtmPT3-Reaktion von A) der Proteinmenge und B) der Inkubationszeit. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 1 mM Verruculogen, 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl₂ und A) unterschiedliche Mengen His₈-FtmPT3 mit einer Inkubationszeit von 60 min bzw. B) 10 µg His₈-FtmPT3 mit variierenden Inkubationszeiten.

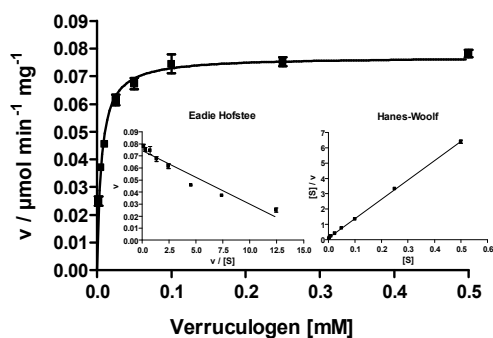
Da die von FtmPT3 katalysierte Reaktion anscheinend der Michaelis-Menten Kinetik folgt, konnten die K_M -Werte anhand der Eadie-Hofstee und Hanes-Woolf Diagramme bestimmt werden. Die K_M -Werte für Verruculogen und DMAPP liegen bei 5,7 und 61,5 µM (Abb. 4-9: A, E). Die höchste Affinität zeigte FtmPT3 dabei zu Verruculogen und Fumitremorgin B. Es konnten maximale Reaktionsgeschwindigkeiten von 0,076 und 0,104 µmol min⁻¹ mg⁻¹ festgestellt werden. Die durchschnittliche Wechselzahl (k_{cat}) wurde mit 0,08 s⁻¹ bestimmt. (Abb. 4-9: A, B). K_M -Werte im Bereich von 40,0 und 157,5 µM und Wechselzahlen (k_{cat}) im Bereich von 0,02 und 0,09 s⁻¹ wurden für die anderen getesteten Substanzen berechnet (Abb. 4-9: B, C, D).

A)

$$K_M = 5,7 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 0,08 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,07 \text{ s}^{-1}$$

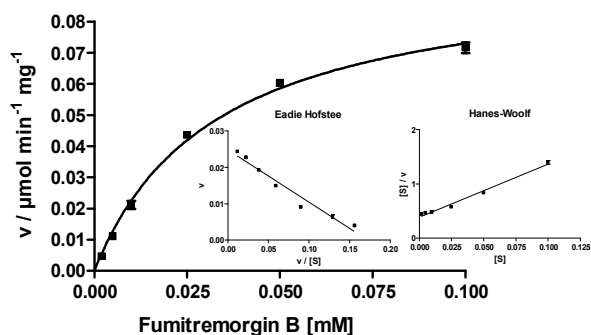


B)

$$K_M = 40,0 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 0,104 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,09 \text{ s}^{-1}$$

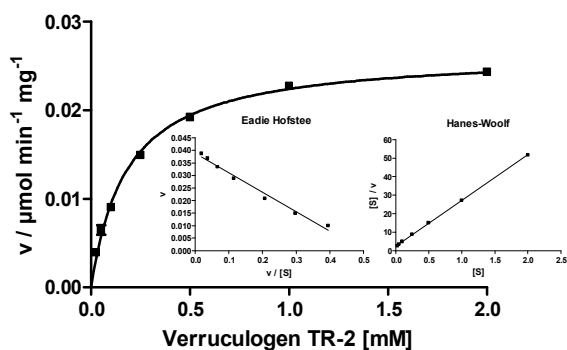


C)

$$K_M = 157,5 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 0,03 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,02 \text{ s}^{-1}$$

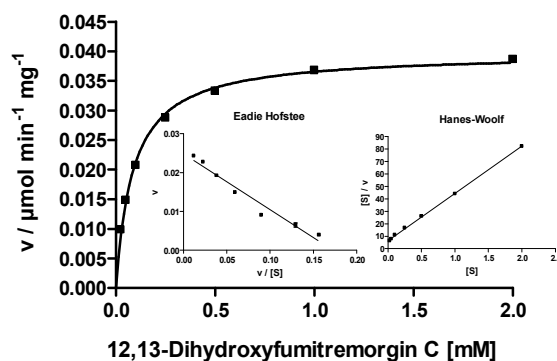


D)

$$K_M = 85,0 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,04 \text{ s}^{-1}$$



E)

$$K_M = 61,5 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 0,08 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 0,07 \text{ s}^{-1}$$

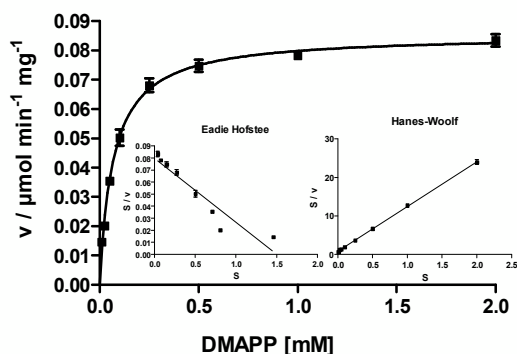


Abb. 4-9: Bestimmung der kinetischen Parameter der von FtmPT3 katalysierten Reaktion mit Hilfe der Eadie-Hofstee und Hanes-Woolf Diagramme für A) Verrucologen, B) Fumitremorgin B, C) Verrucologen TR-2, D) 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C und E) DMAPP.

4.1.2.8 Ionenabhängigkeit der FtmPT3-Reaktion

Um die Ionenabhängigkeit der Reaktion zu untersuchen, wurde Verruculogen mit His₈-FtmPT3 und 1 mM DMAPP in Anwesenheit von EDTA oder verschiedenen Metallionen inkubiert (Abb. 4-10). Der Reaktionsansatz ohne Zusatz diente als Kontrolle und entsprach einer relativen Aktivität von 100 %. Durch die Zugabe von 5 mM CaCl₂ und K⁺ konnte ein leichter Anstieg bis zu 135 % und 112 % der enzymatischen Aktivität von FtmPT3 im Vergleich zu den Reaktionsansätzen ohne Metallionen beobachtet werden. Die Zugabe von Mg²⁺, Mn²⁺ oder Na⁺ zu dem Reaktionsansatz führte hingegen zu keiner signifikanten Änderung der Enzymaktivität. Eine sehr viel geringere Aktivität von 1 % bis 75 % wurde durch die Inkubation mit Zn²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ hervorgerufen.

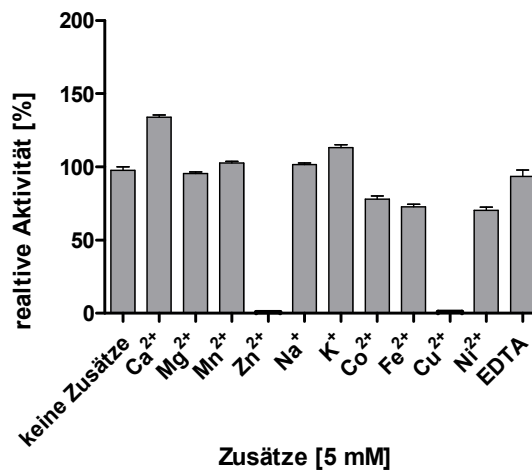


Abb. 4-10: Graphische Darstellung der Ionenabhängigkeit der FtmPT3-Reaktion. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 20 µg His₈-FtmPT3, 1 mM DMAPP, 1 mM Verruculogen und 5 mM des entsprechenden Zusatzes. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C.

4.1.3 Charakterisierung der Prenyltransferase CdpC2PT aus *N. fischeri*

4.1.3.1 Sequenzanalysen von *cdpC2PT*

Das putative Prenyltransferasegen *NFIA_043650* aus *N. fischeri* NRRL181 befindet sich auf einem 34,9 kb großen Genbereich mit 8 benachbarten Genen (Abb. 4-11). Dieser Bereich ist im Genom auf dem Contig AAKE03000020.1 zwischen 20,696 bp und 55,680 bp lokalisiert (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr: DS027684) und umfasst unter anderem eine bimodulare nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) mit einem abgeleiteten Genprodukt das eine Größe von 2661 Aminosäuren (EAW22548) aufweist.

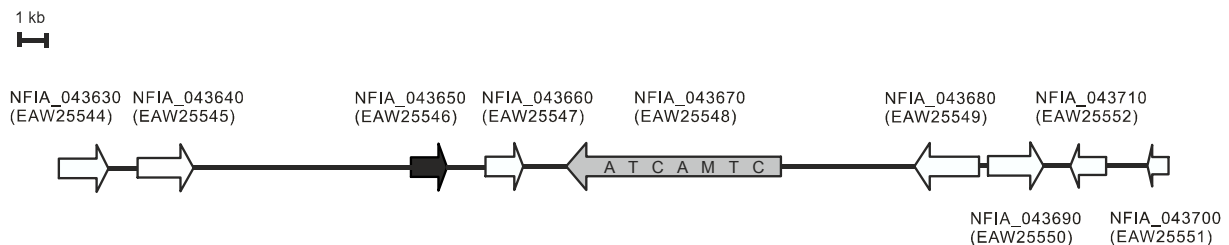


Abb. 4-11: graphische Darstellung von *NFIA_043650* mit benachbarten Genen

EAW25547 codiert durch *NFIA_043660* stellt eine putative Aminooxidase mit einer Größe von 264 Aminosäuren dar und wird durch die Gene für die Prenyltransferase und NRPS eingeschlossen. Etwa 5,5 kb stromabwärts von der Prenyltransferase *NFIA_043650* befinden sich zwei Gene mit einer Größe von 1839 bp und 2078 bp codierend für einen Major Facilitator Superfamilie- (MFS) und Aminosäure-Transporter. 3,3 kb stromaufwärts von der NRPS *NFIA_043670* konnten 4 potentielle Gene (*NFIA_043680* – *NFIA_043710*) codierend für ein C6 Finger Domän Protein, eine Aldolase und ein Glutathion S-Transferase Familienprotein festgestellt werden (Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Lokalisation des Prenyltransferase-Gens *NFIA_043650* und angrenzende Gene auf dem Contig AAKE03000020.1 von *N. fischeri* NRRL181

Gen	Protein	Lokalisation (bp)	Größe (aa)	putative Funktion
NFIA_043630	EAW25544	20696-22534	437	Aminosäuren Transporter
NFIA_043640	EAW25545	23296-25373	609	Major Facilitator Superfamilie Transporter
NFIA_043650	CdpC2PT	30953-32343	445	C2-Prenyltransferase
NFIA_043660	EAW25547	33178-34572	464	Aminooxidase
NFIA_043670	EAW25548	35719-43704	2661	NRPS
NFIA_043680	EAW25549	47050-49455	750	C6 Finger Domän Protein
NFIA_043690	EAW25550	49705-51777	690	-
NFIA_043700	EAW25551	52505-53837	391	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonat Aldolase
NFIA_043710	EAW25552	54895-55680	227	Glutathion S-Transferase Familienprotein

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Lokalisation des Gens *NFIA_043650* (im weiteren Verlauf als *cdpC2PT* bezeichnet), welches zu der DMATS Superfamilie gehört, in der *N. fischeri* NRRL181 Genomsequenz zwischen 30,953 und 32,173 bp (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. DS027684) angenommen. Die NCBI-Annotierung ergab ein Gen bestehend aus einem Exon mit einer Größe von 1221 bp und ein abgeleitetes Genprodukt mit einer Länge von 406 Aminosäuren (EAW25546). Durch den Sequenzvergleich mit Aminosäure-Sequenzen bereits charakterisierter Prenyltransferasen (Anhang 7.1.2) und unter der Nutzung des Programmes FGENESH, wurde eine 170 bp längere Gensequenz als die NCBI-Vorhersage vermutet. Die korrigierte Gensequenz ist in dem Genom zwischen 30,953 bp und 32,343 bp (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. DS027684) vorzufinden und besteht aus 2 Exons mit einer Länge von jeweils 1220 bp und 118 bp, die durch ein Intron mit einer Größe von 53 bp unterbrochen werden. Das resultierende Protein umfasst eine Länge von 445 Aminosäuren und besitzt eine theoretische Masse von 50,5 kDa. Die Vorhersage wurde durch PCR-Amplifikation von gDNA und cDNA und anschließender Sequenzierung bestätigt. Die geänderte Gensequenz wurde bei der GenBank unter der Accession Nr. KF220294 hinterlegt. Der Vergleich der Proteinsequenz mit bereits bekannten Prenyltransferasen der DMATS Superfamilie aus diversen Pilzen zeigte signifikanten Sequenzidentitäten. CdpC2PT zeigt Identitäten auf Aminosäureebene von 40 % mit der C2-Prenyltransferase BrePT aus *Aspergillus versicolor* (*A. versicolor*) NRRL573 (Yin *et al.*, 2013), 42 % mit NotF aus *Aspergillus sp.* MF297-2 (Ding *et al.*, 2010) und 27 % mit FtmPT1 aus *A. fumigatus* (Grundmann & Li 2005). Sequenzidentitäten von 33 % und 31 % konnten zwischen CdpC2PT und den C3-Prenyltransferasen AnaPT sowie CdpNPT aus *N. fischeri* und *A. fumigatus* festgestellt werden (Schuller *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009b). Basierend auf den relativ hohen Sequenzidentitäten von CdpC2PT mit BrePT, NotF und anderen zyklischen Dipeptid Prenyltransferasen wurde vermutet, dass CdpC2PT die Prenylierung von zyklischen Dipeptiden katalysiert.

4.1.3.2 Amplifikation von *cdpC2PT* aus gDNA und cDNA von *N. fischeri* NRRL181

cdpC2PT wurde von gDNA aus *N. fischeri* NRRL181 mit Hilfe des High Fidelity PCR-Kits von Roche und durch Fusions-PCR (3.6.4) amplifiziert. Die Primer KM_043650-1 und KM_043650-3 wurden für die Amplifikation des 1. Exons (Abb. 4-12 A: 1. Exon) und die Primer KM_043650-2 sowie KM_043650-4 für die des 2. Exons (Abb. 4-12 A: 2. Exon) verwendet. Durch den Primer KM_043650-4 wurde das enthaltene Stopcodon für eine spätere Aufreinigung in dem Expressionsvektor pQE60 mittels Histidin-tag mutiert. Die Fusion beider Exons erfolgte durch die Primer KM_043650-1 und KM_043650-4 (Abb. 4-12 B: Fusion). Die Intron-Vorhersage wurde durch die Amplifikation des Gens von cDNA und der anschließenden Klonierung in den Klonierungsvektor und dessen Sequenzierung bestätigt (Abb. 4-12 C: cDNA). Wie aus dem Agarosegel in Abb. 4-12 zu erkennen, waren die Amplifikationen erfolgreich.

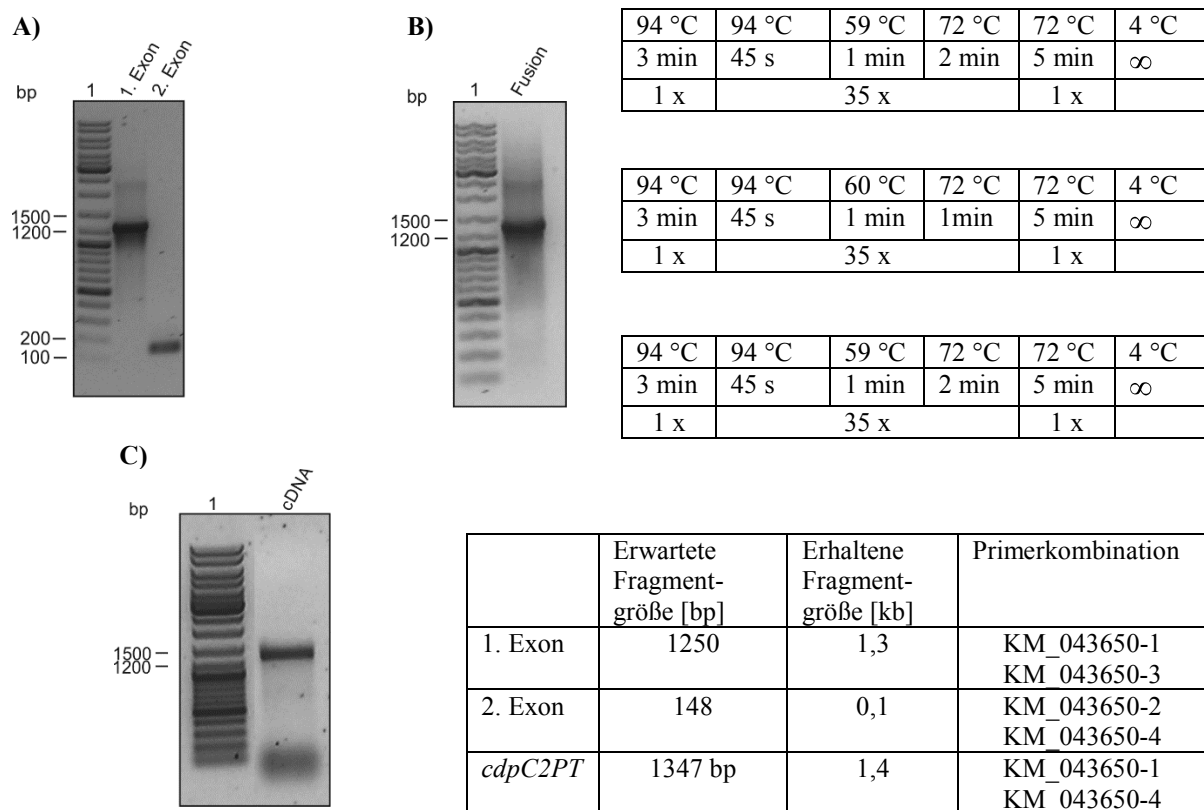
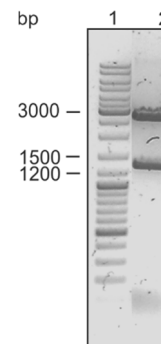
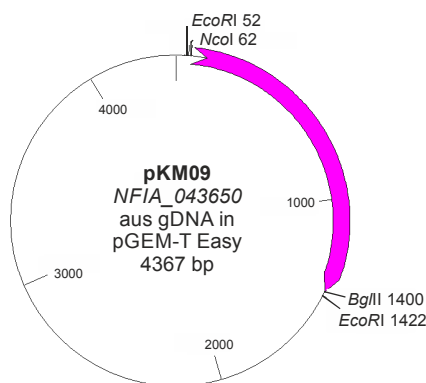


Abb. 4-12: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *cdpC2PT* aus gDNA und cDNA. A): Amplifikation der Exons 1 und 2 aus gDNA, B): Fusion Exon 1 und 2 aus gDNA, C): Amplifikation aus cDNA; Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

4.1.3.3 Klonierung und Transformation

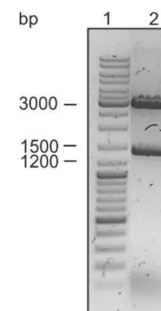
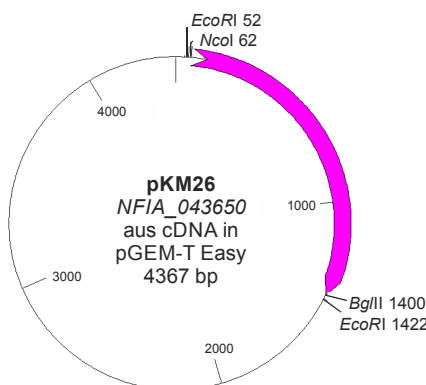
Die resultierenden PCR-Fragmente von gDNA und cDNA mit einer Größe von jeweils 1347 bp wurden jeweils in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert und durch Hitzeschock in *E. coli* DH5 α transformiert. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert, die Plasmid-DNA isoliert und mit Hilfe eines *EcoRI*-Verdaus untersucht (Abb. 4-13 A, B: Laufspur 2). Durch eine Sequenzierung der Klonierungskonstrukte wurde die fehlerfreie Basensequenz von *cdpC2PT*, die vorhergesagte Intronsequenz und die Mutation des Stopcodons in den Konstrukten pKM09 (gDNA) und pKM26 (cDNA) bestätigt.

A)



berechnete Fragmentgrößen:
EcoRI: 2997 bp + 1370 bp

B)



berechnete Fragmentgrößen:
EcoRI: 2997 bp + 1370 bp

Abb. 4-13: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von A) pKM09 (*cdpC2PT* in pGEM-T Easy aus gDNA) und B) pKM26 (*cdpC2PT* in pGEM-T Easy aus cDNA) mit zugehörigen Vektorkarten. Dargestellt sind für die Überprüfung sowie für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Um das Expressionskonstrukt pKM16 zu erhalten, wurde das Plasmid pKM09 mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BglII* geschnitten. Das resultierende *NcoI*-*BglII* Fragment mit einer Größe von 1338 bp wurde aus dem Agarosegel isoliert und in den Expressionsvektor

pQE60 umkloniert, der zuvor mit *Nco*I und *Bgl*II geschnitten wurde. Das nach der Umklonierung erhaltene und mittels *Nco*I/*Bgl*II-Verdaus kontrollierte Plasmid wurde als pKM16 bezeichnet (Abb. 4-14).

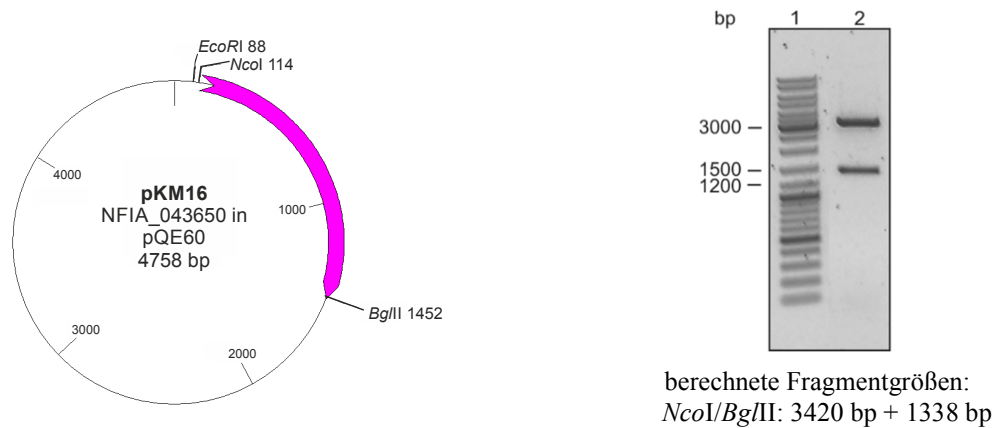


Abb. 4-14: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM16 (*cdpc2PT* in pQE60) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.1.3.4 Überproduktion und Reinigung von CdpC2PT-His₆

Die Genexpression erfolgte in *E. coli* M15 [pREP4] Zellen nach der Induktion durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG bei 30 °C für 6 h in LB-Medium. Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnten 4 mg CdpC2PT-His₆ aus einem Liter Kultur gewonnen werden. Eine Analyse der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE (Abb. 4-15) zeigte für das Protein ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa, das mit dem theoretischen Molekulargewicht von CdpC2PT-His₆ von 51,3 kDa übereinstimmte.

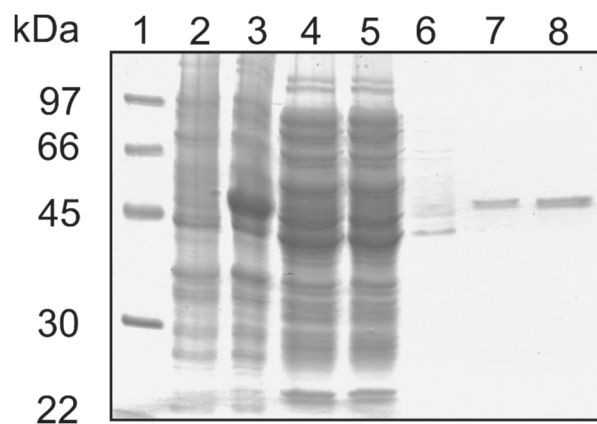


Abb. 4-15: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von CdpC2PT-His₆ (pKM16) in *E. coli* M15 [pREP4]. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 6 h Induktion, Spur 4: löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1, Spur 8: Elutionsfraktion 2.

4.1.3.5 Aktivitätstest mit CdpC2PT

Aufgrund der hohen Identität auf Aminosäureebene zu den Prenyltransferasen BrePT und NotF, welche die Prenylierung von zyklischen Dipeptiden an Position C-2 katalysieren, wurde für den enzymatischen Aktivitätsnachweis CdpC2PT mit 18 vorhanden zyklischen Dipeptiden in Gegenwart von 5 mM CaCl_2 und 1 mM DMAPP in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C inkubiert (Abb. 4-16).

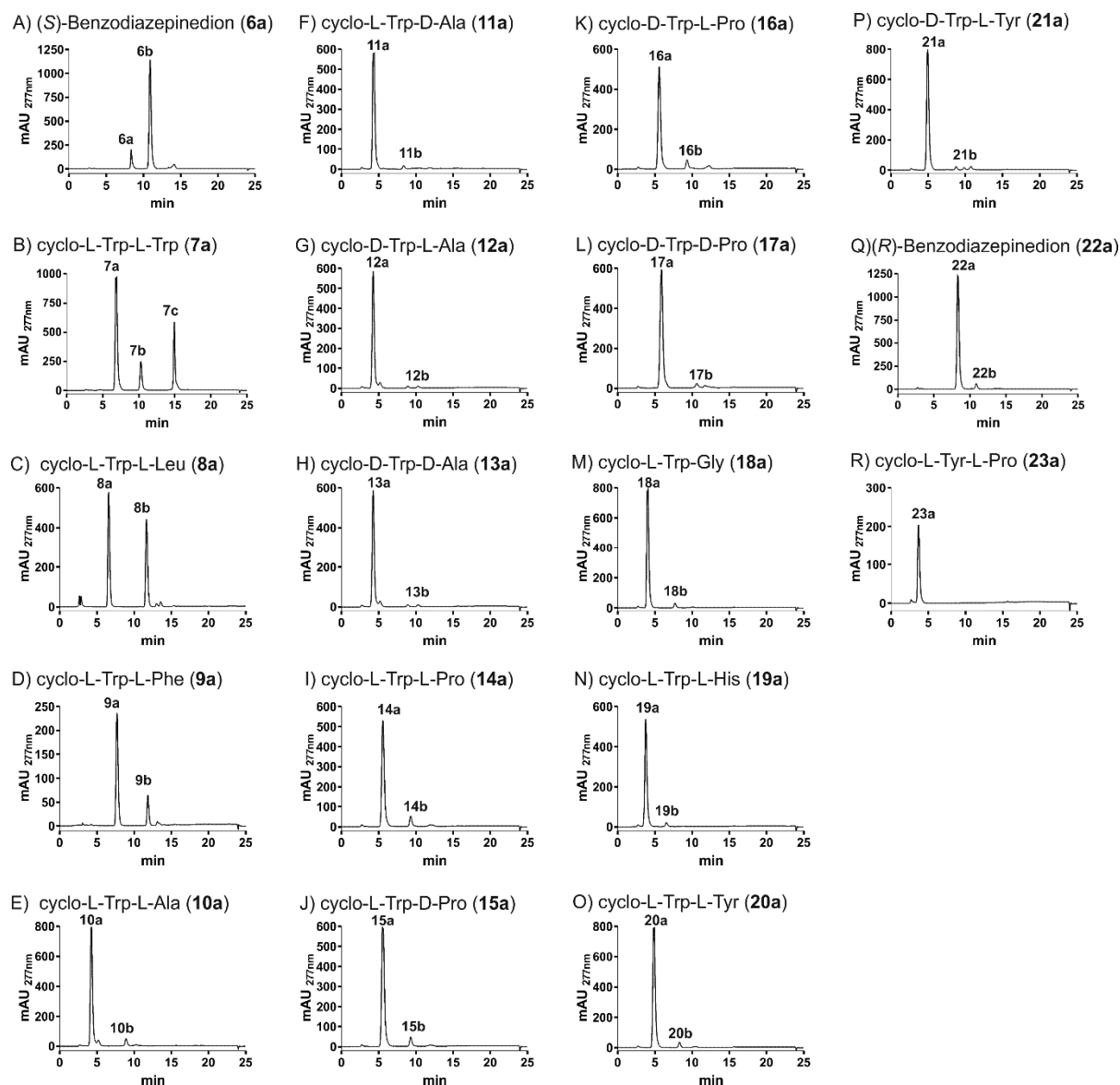


Abb. 4-16: HPLC-Chromatogramme der Enzymassays für den Aktivitätsnachweis von CdpC2PT in Anwesenheit von DMAPP. Die Standards sind mit a und die entsprechenden Produkte mit b gekennzeichnet. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 20 μg CdpC2PT-His₆, 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP und 5 mM CaCl_2 .

Die Inkubation von 17 zyklischen Dipeptiden (**6a-22a**) in Anwesenheit von 20 μg CdpC2PT und 1 mM DMAPP führte jeweils zur Bildung eines zusätzlichen Peaks (**6b-22b**) bzw. eines

zweiten Produktpeaks (**7c**). Mit dem Substrat cyclo-L-Tyr-L-Pro konnte hingegen kein zusätzlicher Peak beobachtet werden (Abb. 4-16 R).

Um einen direkten Vergleich der enzymatischen Aktivität zwischen CdpC2PT und der Prenyltransferase BrePT zu erhalten, wurde auch His₅-BrePT nach den angegebenen Bedingungen aufgereinigt (Yin *et al.*, 2013) und ebenfalls mit allen 18 zyklischen Dipeptiden in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ und 1 mM DMAPP in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C inkubiert. Ein Vergleich der relativen Aktivitäten beider Enzyme ist in Tab. 4-4 aufgeführt.

Tab. 4-4: Relative Aktivitäten der Enzymassays mit CdpC2PT und BrePT

Substrat	Umsetzung [%]		Substrat	Umsetzung [%]	
	CdpC2PT	BrePT		CdpC2PT	BrePT
(S)-Benzodiazepinedion (6a)	85	8	cyclo-D-Trp-L-Pro (16a)	9	13
cyclo-L-Trp-L-Trp (7a)	48	8	cyclo-D-Trp-D-Pro (17a)	4	25
cyclo-L-Trp-L-Leu (8a)	37	46	cyclo-L-Trp-Gly (18a)	4	39
cyclo-L-Trp-L-Phe (9a)	17	31	cyclo-L-Trp-L-His (19a)	5	22
cyclo-L-Trp-L-Ala (10a)	8	35	cyclo-L-Trp-L-Tyr (20a)	5	11
cyclo-L-Trp-D-Ala (11a)	5	29	cyclo-D-Trp-L-Tyr (21a)	3	3
cyclo-D-Trp-L-Ala (12a)	8	22	(R)-Benzodiazepinedion (22a)	5	6
cyclo-D-Trp-D-Ala (13a)	5	13	cyclo-L-Tyr-L-Pro (23a)	-	-
cyclo-L-Trp-L-Pro (14a)	8	78	L-Tryptophan	-	-
cyclo-L-Trp-D-Pro (15a)	9	72	L-Tyrosin	-	-

-: keine Produktbildung detektierbar

Wie aus Tab. 4-4 eindeutig hervorgeht, weisen beide Prenyltransferasen eine unterschiedliche Substratpräferenz auf. Mit einer maximalen Umsetzung von 85 % und 48 % konnte für CdpC2PT (S)-Benzodiazepindion (**6a**) und cyclo-L-Trp-L-Trp (**7a**) als Hauptsubstrat festgestellt werden. In den Reaktionsansätzen mit BrePT hingegen konnte nach Inkubation mit diesen Substraten nur eine geringe Umsetzung von jeweils 8 % beobachtet werden. Interessanterweise zeigte die Inkubation von CdpC2PT mit (R)-Benzodiazepindion (**22a**) eine niedrige Umsetzung von nur 5 %. In den Aktivitätsassays mit cyclo-L-Trp-L-Trp und CdpC2PT wurden zudem zwei Produktpeaks mit Retentionszeiten von 10,3 min (**7b**) und 14,9 min (**7c**) über HPLC nachgewiesen. Cyclo-L-Trp-L-Pro (**14a**) stellte sich mit einer Umsetzung von 78 % als Hauptsubstrat für BrePT heraus. Die entsprechenden HPLC-Chromatogramme und katalysierenden Reaktionen sind in Abb. 4-17 dargestellt.

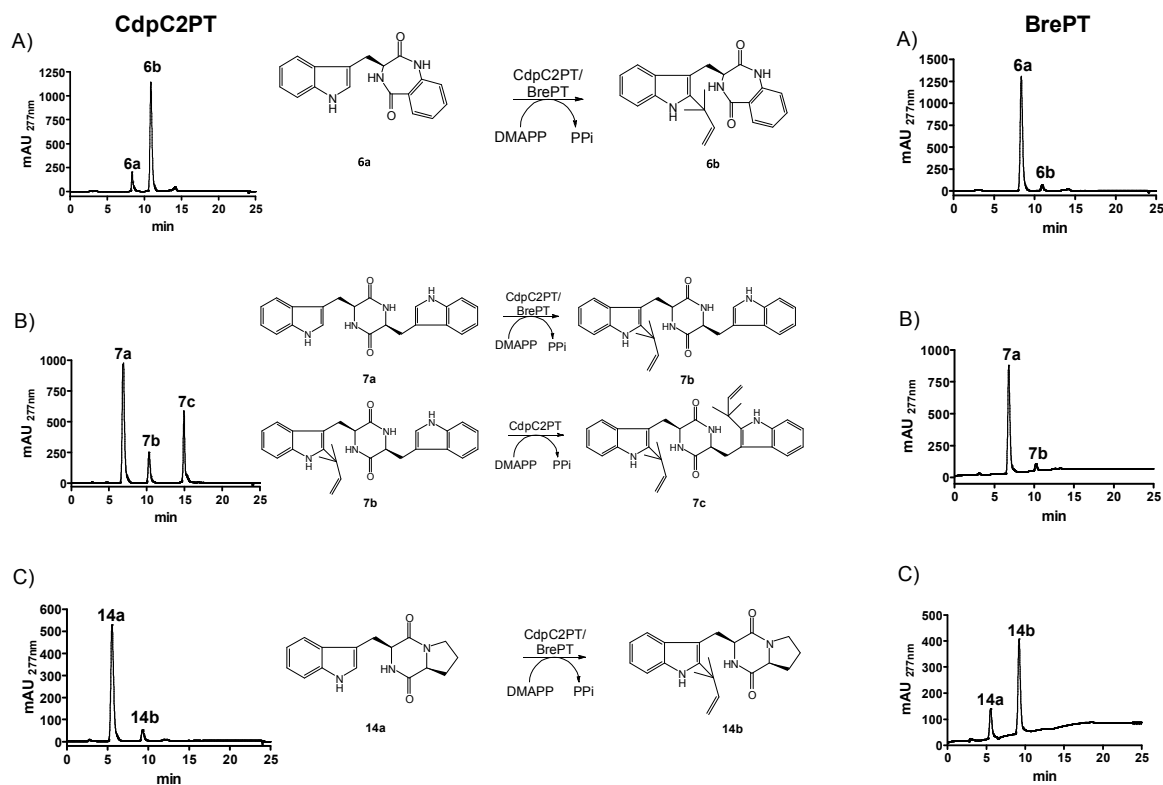


Abb. 4-17: HPLC-Chromatogramme der Enzymassays für den Aktivitätsvergleich von CdpC2PT und BrePT in Anwesenheit von DMAPP. A) (*S*)-Benzodiazepindion (6a), B) cyclo-L-Trp-L-Trp (7a) und C) cyclo-L-Trp-L-Pro (14a). Die Standards sind mit a und die entsprechenden Produkte mit b und c gekennzeichnet. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 20 µg CdpC2PT-His₆ und 15 µg His₅-BrePT, 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP und 5 mM CaCl₂.

Die Stereoisomere von cyclo-Trp-Ala (**10a-13a**) und cyclo-Trp-Pro (**14a-17a**) konnten durch BrePT mit 13 % bis 35 % und 13 % bis 78 % relativer Aktivität umgesetzt werden. Nach der Inkubation mit denselben Substraten wies CdpC2PT sehr viel geringere Umsetzungswerte von 4 bis 8 % auf (Tab. 4-4).

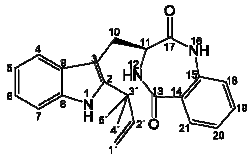
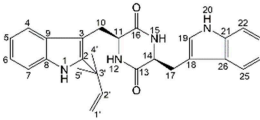
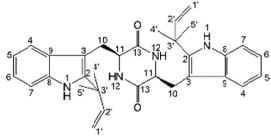
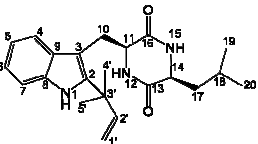
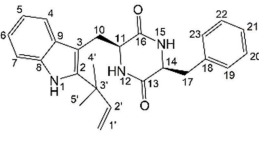
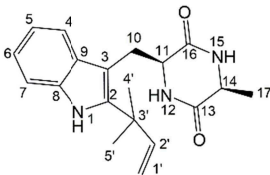
4.1.3.6 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte mit CdpC2PT-His₆

Für die Isolierung der enzymatischen Produkte (**6b-10b**, **7c**) wurde jeweils ein 10 ml Reaktionsansatz mit 2 mg CdpC2PT-His₆, 1 mM DMAPP und 1 mM Substrat angesetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung des Produktes erfolgte mittels HPLC. Die Strukturen der Produkte wurden mittels HR-EI-MS und ¹H-NMR aufgeklärt. Die ¹H-NMR-Spektren der Produkte befinden sich im Anhang (Kapitel 7.3: Abb.7- 17 - Abb.7-22). Mit Hilfe der ¹H-NMR Analyse konnten die Strukturen der Produkte aufgeklärt werden (Tab. 4-6). Der Vergleich der ¹H-NMR-Spektren der enzymatischen Produkte (**6b-10b**, **7c**) mit den entsprechenden Spektren der Substrate (Daten nicht gezeigt) wies eindeutig das Vorhandensein von Signalen für einen reversen Prenylrest bei δ_H 6,11 – 6,21 (dd, H-2'), 5,06 – 5,21 (d, H-1'), 5,09 – 5,21 (d, H-1'), 1,51 – 1,58 (s, 3H-4') und 1,51 – 1,59 ppm (s, 3H-5') auf. Zusätzlich dazu war das Singulet für H-2 in allen ¹H-NMR Spektren der isolierten Produkte nicht mehr vorzufinden. Signale für alle anderen aromatischen Protonen veränderten sich jedoch kaum. Dies lässt vermuten, dass die enzymatischen Produkte **6b-10b** eine reverse Prenylierung an Position C-2 des Indolrings tragen und CdpC2PT eine reverse C-2 Prenylierung von zyklischen Dipeptiden katalysiert. Außerdem konnte mit dem Produkt **7c** ein symmetrisch revers diprenyliertes Derivat von cyclo-L-Trp-L-Trp nachgewiesen werden. Zudem stimmten die gemessenen ¹H-NMR-Daten der isolierten Produkte **6b-10b** und **7c** gut mit den zuvor publizierten Daten überein (Kozlovsky *et al.*, 2001a; Kozlovsky *et al.*, 2001b; Yin *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2009a). Die Massen aller enzymatischen Produkte von CdpC2PT (**6b-10b**) wurden zusätzlich durch HR-EI-MS bestätigt (Tab. 4-5, Kapitel 7.3: Abb.7-11 - Abb.7-16). Dabei zeigten alle isolierten Produkte (**6b-10b**) eine molekulare Masse auf, die 68 kDa größer war als die des zugehörigen Substrates, was auf eine einfache Prenylierung innerhalb der Struktur hindeutet. Die HR-EI-MS des Produktes **7c** konnte mit m/z 508,2820 [M⁺] die zusätzliche Prenylierungseinheit im Vergleich zum Produkt **7b** belegen.

Tab. 4-5: HR-EI-MS-Daten der enzymatischen Produkte von CdpC2PT.

Isolierte Produkte von CdpC2PT	Summenformel	HR-EI-MS Daten		Abweichung (ppm)
		Berechnet	Gemessen	
6b	C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O ₂	373,1790 [M ⁺]	373,1776	3,7
7b	C ₂₇ H ₂₈ N ₄ O ₂	440,2212 [M ⁺]	440,2210	0,4
7c	C ₃₂ H ₃₆ N ₄ O ₂	508,2838 [M ⁺]	508,2820	3,6
8b	C ₂₂ H ₂₉ N ₃ O ₂	367,2259 [M ⁺]	367,2229	8,3
9b	C ₂₅ H ₂₇ N ₃ O ₂	401,2103 [M ⁺]	401,2073	7,5
10b	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₂	325,1790 [M ⁺]	325,1767	7,0

Tabelle 4- 6: ¹H-NMR-Daten der enzymatischen Produkte von CdpC2PT.

						
	6b (in CDCl ₃)	7b (in CDCl ₃)	7c (in CDCl ₃)	8b (in CD ₃ OD)	9b (in CD ₃ OD)	10b (in CD ₃ OD)
Position	δ _H [ppm] Multiplizität (<i>J</i> [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (<i>J</i> [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (<i>J</i> [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (<i>J</i> [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (<i>J</i> [Hz])	δ _H [ppm] Multiplizität (<i>J</i> [Hz])
NH-1	8,01 br s	8,01 br s	8,08 br s	-	-	-
4	7,38 d (8,0)	7,39 d (8,1)	7,53 d (7,9)	7,52 d (7,9)	7,29 d (8,1)	7,51 d (8,0)
5	7,05 t (7,5)	7,06 d (8,0; 1,1)	7,13 ddd (8,0, 7,0, 1,0)	6,97 t (7,5)	7,00 dd (8,1; 7,0)	6,99 ddd (8,0; 7,0; 1,1)
6	7,15 td (7,6; 1,0)	7,15 dd (8,1; 1,0)	7,19 ddd (8,0, 7,0, 1,1)	7,05 t (7,6)	7,06 dd (8,1; 7,0)	7,06 ddd (8,0; 7,0; 1,1)
7	7,32 d (8,0)	7,17 dd (7,5; 1,1)	7,35 d (8,0)	7,31 d (8,0)	7,29 d (8,1)	7,33 d (8,0)
10a	3,49 dd (15,6; 9,7)	3,54 dd (14,4; 3,1)	3,74 dd (14,6, 3,4)	3,51 dd (14,7; 4,1)	2,75 dd (13,6; 5,2)	3,54 dd (14,6; 3,8)
10b	3,44 dd (15,6; 5,7)	3,01 dd (14,4; 9,4)	3,26 dd (14,6, 11,8)	3,34 dd (14,7; 8,5)	3,57*	3,3*
11	4,21 dt (9,8; 5,7)	4,29 d (10,9)	4,40 d (11,8)	4,26 dd (8,5; 4,1)	4,19 t (5,2)	4,28 ddd (9,7; 3,9; 1,0)
12	6,10 d (4,7)	5,75 br s	5,73 br s	-	-	-
14	-	4,29 d (10,9)	-	3,80 dd (9,5; 4,5)	4,12 dd (9,1; 3,7)	3,94 qd (7,1; 1,0)
15	-	5,99 br s	-	-	-	-
16	7,54 br s	-	-	-	-	-
17a	-	3,60 dd (14,7; 3,4)	-	1,43 ddd (14,0; 9,5; 4,4)	2,99 dd (14,7; 3,7)	1,30 d (7,1)
17b	-	2,85 dd (14,7; 10,9)	-	1,15 ddd (14,0; 9,5; 4,4)	2,42 dd (14,7; 9,1)	-
18	6,96 d (8,1)	-	-	1,65 m	-	-
19	7,50 td (7,8; 1,6)	7,04 s	-	0,88 d (6,6)	7,10 d (7,0)	-
20	7,23 t (7,7)	8,15 br s	-	0,86 d (6,6)	7,33 t (7,5)	-
21	7,85 dd (7,8; 1,6)	-	-	-	7,24 t (7,5)	-
22	-	7,30 d (8,0)	-	-	7,33 t (7,5)	-
23	-	7,24 dd (8,0; 1,0)	-	-	7,10 d (7,0)	-
24	-	7,20 d (7,9)	-	-	-	-
25	-	7,66 d (7,9)	-	-	-	-
1'	5,21 d (17,5) 5,19, d (10,6)	5,20 d (10,6) 5,16 d (17,3)	5,21 d (17,5) 5,21 d (10,4)	5,16 dd (17,5; 1,2) 5,11 dd (10,6; 1,2)	5,06 d (10,4) 5,09 d (17,6)	5,15 dd (17,5; 1,2) 5,11 dd (10,6; 1,2)
2'	6,18 dd (17,5; 10,6)	6,11 dd (17,3; 10,6)	6,16 dd (17,6; 10,4)	6,21 dd (17,5; 10,6)	6,13 dd (17,6; 10,4)	6,21 dd (17,5; 10,6)
4'	1,55 s	1,52 s	1,58 s	1,56 s	1,51 s	1,56 s
5'	1,53 s	1,52 s	1,59 s	1,56 s	1,51 s	1,56 s

*Signale überlappend mit denen vom Lösungsmittel

4.1.3.7 Biochemische Eigenschaften von CdpC2PT-His₆ und Bestimmung der kinetischen Parameter

Mittels Größenausschlusschromatographie konnte das Molekulargewicht von CdpC2PT-His₆ in seinem nativen Zustand als 101 kDa bestimmt werden. Das weist darauf hin, dass das Protein in seiner aktiven Form als Homodimer vorliegt. Die Produktbildung bei einem 100 µl Reaktionsansatz befindet sich mit 10 µg CdpC2PT-His₆ bzw. 60 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abb. 4-18).

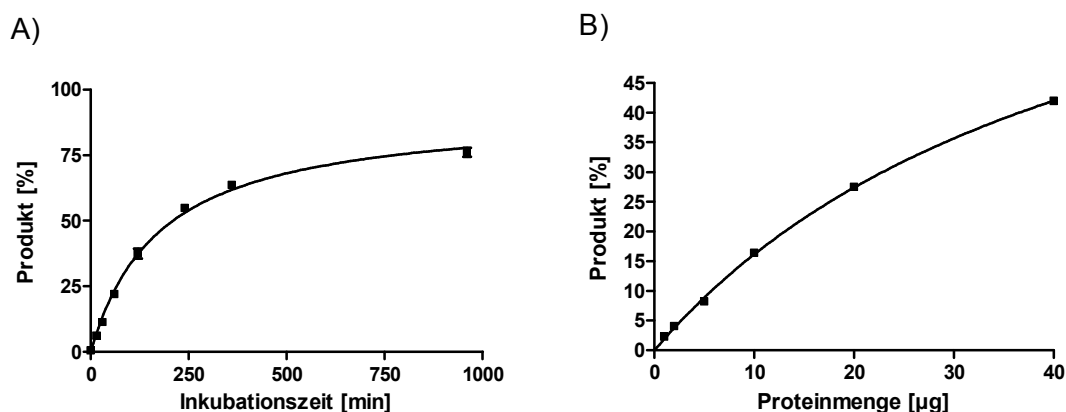


Abb. 4-18: Abhängigkeit der Produktbildung der CdpC2PT-Reaktion von A) der Proteinmenge und B) der Inkubationszeit. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 1 mM (*S*)-Benzodiazepindion, 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl₂ und A) unterschiedliche Mengen CdpC2PT-His₆ mit einer Inkubationszeit von 60 min bzw. B) 10 µg CdpC2PT-His₆ mit variierenden Inkubationszeiten.

Um das Verhalten von CdpC2PT gegenüber DMAPP, 5 ausgewählten zyklischen Dipeptiden (**6a-10a**) und dem cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp (**7b**) zu untersuchen, wurden die kinetischen Parameter inklusive Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) und Wechselzahlen (k_{cat}) anhand der Eadie-Hofstee-, Hanes-Woolf- und Lineweaver-Burk-Diagramme bestimmt (Abb. 4-19). Die von CdpC2PT katalysierten Reaktionen folgen dabei offenbar der Michaelis-Menten-Kinetik.

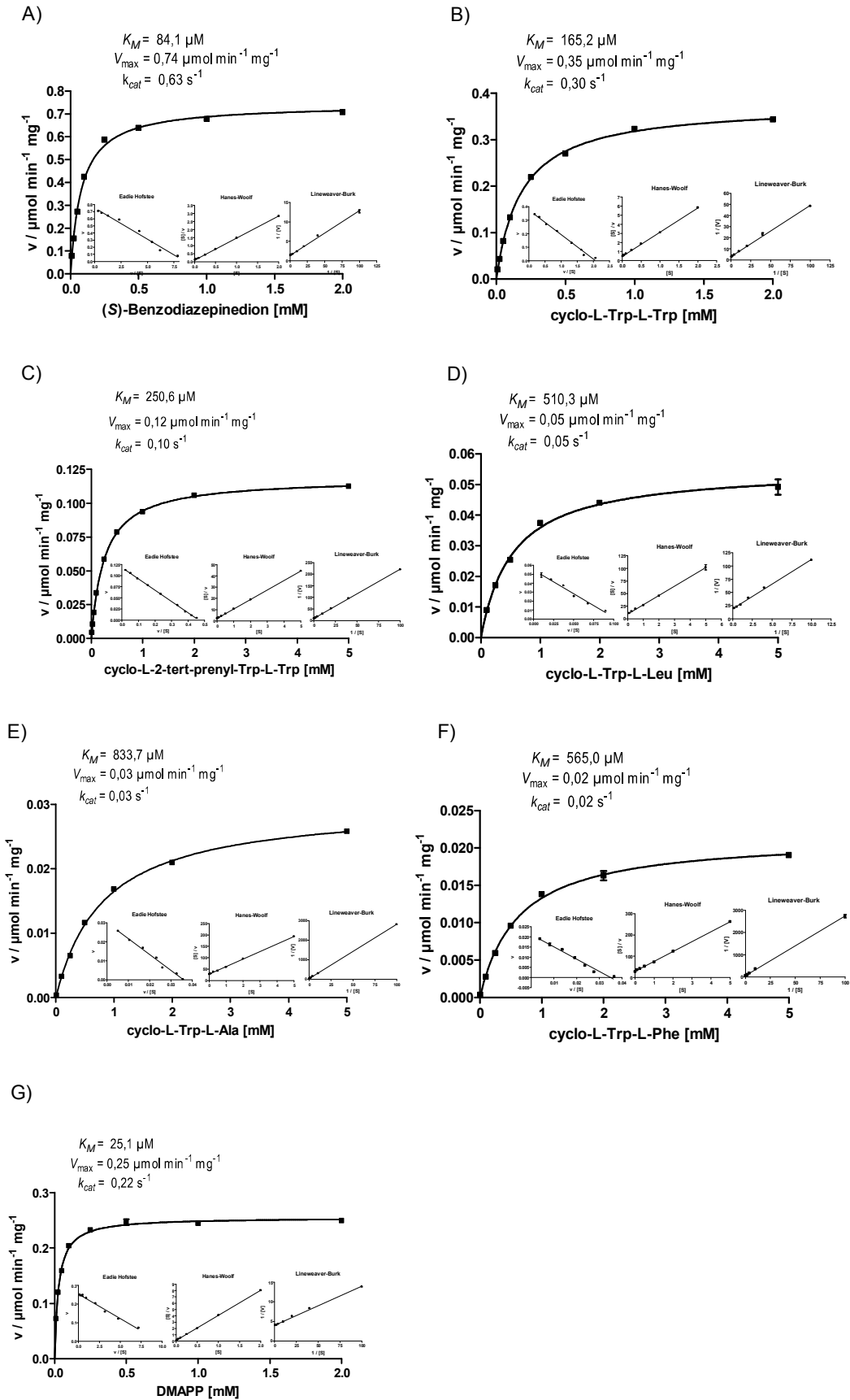


Abb. 4-19: Bestimmung der kinetischen Parameter der von CdpC2PT katalysierten Reaktion mit Hilfe der Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Diagramme für A) (S)-Benzodiazepindion, B) cyclo-L-Trp-L-Trp, C) cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp und D) cyclo-L-Trp-L-Leu, E) cyclo-L-Trp-L-Ala, F) cyclo-L-Trp-L-Phe und G) DMAPP.

Unter allen getesteten aromatischen Substraten zeigt CdpC2PT die beste Affinität zu (S)-Benzodiazepindion (**6a**) und cyclo-L-Trp-L-Trp (**7a**) mit K_M -Werten von 84,1 und 165,2 μM (Abb. 4-19: A, B). Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten konnten mit 0,74 und 0,35 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ beobachtet werden. Die durchschnittliche Wechselzahl (k_{cat}) wurde mit 0,47 s^{-1} bestimmt (Abb. 4-19: A, B). Das Substrat cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp (**7b**) zeigte mit 250,6 μM einen höheren K_M -Wert als das eigentliche Substrat cyclo-L-Trp-L-Trp. Für die getesteten Substrate cyclo-L-Trp-L-Leu (**8a**), cyclo-L-Trp-L-Phe (**9a**) und cyclo-L-Trp-L-Ala (**10a**) wurden K_M -Werte im Bereich von 510,3 und 833,7 μM und Wechselzahlen (k_{cat}) im Bereich von 0,02 und 0,05 s^{-1} berechnet (Abb. 4-19: D, E, F). Mit einem K_M -Wert von 25,1 μM zeigt CdpC2PT eine hohe Affinität zu seinem Prenyldonor DMAPP auf (Abb. 4-19: G).

4.1.3.8 Ionenabhängigkeit der CdpC2PT-Reaktion

Die Ionenabhängigkeit der CdpC2PT-Reaktion wurde durch die Inkubation von (S)-Benzodiazepindion mit CdpC2PT-His₆ und 1 mM DMAPP in Anwesenheit von EDTA oder verschiedenen Metallionen untersucht (Abb. 4-20). Als Kontrolle diente dabei der Reaktionsansatz ohne Metallionen bzw. mit EDTA und entsprach einer relativen Aktivität von 100 %. Nach der Zugabe von 5 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} konnte ein signifikanter Anstieg der enzymatischen Aktivität von CdpC2PT von 155 % und 136 % im Vergleich zu den Reaktionsansätzen ohne Metallionen detektiert werden. Die Zugabe von Mn^{2+} , Na^+ , K^+ und Co^{2+} zu dem Reaktionsansatz führte hingegen zu keiner großen Änderung der Enzymaktivität. Eine sehr viel geringere enzymatische Aktivität von 1 % bis 58 % wurde bei der Inkubation mit Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} beobachtet.

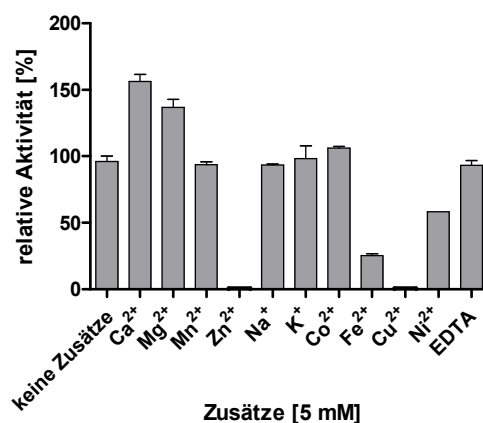


Abb. 4-20: Graphische Darstellung der Ionenabhängigkeit der CdpC2PT-Reaktion. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 20 μg CdpC2PT-His₆, 1 mM DMAPP, 1 mM (S)-Benzodiazepindion und 5 mM des entsprechenden Zusatzes. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C.

4.1.4 Analysen zur putativen Prenyltransferase NFIA_062330 aus *N. fischeri* NRRL181

4.1.4.1 Einleitung

Das putative Prenyltransferasegen *NFIA_062330*, ist auf dem Genom-Contig 574 von *N. fischeri* NRRL181 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NW_001509768) lokalisiert. Die durch NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vorhergesagte Größe beträgt 1770 bp (216,771 bp bis 218,540 bp) und das abgeleitete Genprodukt umfasst 590 Aminosäuren. Die Analyse von *NFIA_062330* und benachbarter Gene (Abb. 4-21) zeigte keine signifikanten Identitäten zu bereits identifizierten Biosynthese-Genclustern auf.

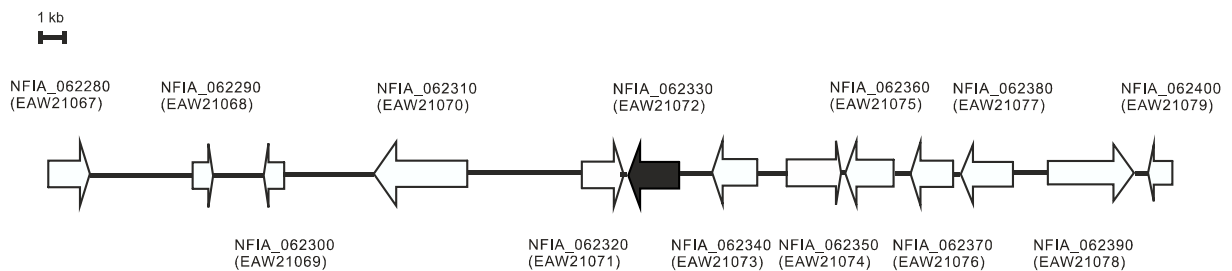


Abb. 4-21: graphische Darstellung von *NFIA_062330* mit benachbarten Genen

Auch die Sequenzvergleiche der einzelnen Gene auf Aminosäureebene durch BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ergaben keine Rückschlüsse auf ein putatives Gencluster (Tab. 4-6).

Tab. 4-6: Sequenzanalysen von *NFIA_062330* und benachbarter Gene.

Gen	Protein	Lokalisation (bp)	Größe (aa)	putative Funktion
NFIA_062280	EAW21067	201610-202750	318	Dehydrogenase
NFIA_062290	EAW21068	205643-206192	143	hypothetisches Protein
NFIA_062300	EAW21069	206977-207494	150	Chromo Domän Protein
NFIA_062310	EAW21070	209983-212547	785	hypothetisches Protein
NFIA_062320	EAW21071	215771-216849	320	Dehydrogenase
NFIA_062330	EAW21072	216771-218540	590	Prenyltransferase der DMATS Superfamilie
NFIA_062340	EAW21073	219223-220170	315	FacC extrazelluläres Signalprotein
NFIA_062350	EAW21074	221011-222153	380	hypothetisches Protein
NFIA_062360	EAW21075	222191-223511	391	hypothetisches Protein
NFIA_062370	EAW21076	223946-225108	368	Oxidoreduktase
NFIA_062380	EAW21077	225263-226702	479	Pektatlyase
NFIA_062390	EAW21078	227631-229981	668	Polyprenyl Synthase
NFIA_062400	EAW21079	230298-230966	222	hypothetisches Protein

Die vorhergesagte Gensequenz von *NFIA_062330* stellte sich nach dem Sequenzvergleich mit bereits bekannten Prenyltransferasen auf Aminosäureebene und durch die Verwendung des

Programmes FGENESH, als zu lang heraus. Die abgeänderte Sequenz, bestehend aus einem Exon mit einer Größe von 1362 bp (216,976 bp bis 218,337 bp) und einem abgeleiteten Genprodukt von 454 Aminosäuren, wurde für den weiteren Sequenzvergleich mit ausgewählten Prenyltransferasen auf Aminosäureebene verwendet (Anhang 7.1.3). Wie in Tab. 4-7 veranschaulicht, konnten keine signifikanten Identitäten zu anderen bereits bekannten Prenyltransferasen festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete jedoch die putative Prenyltransferase *ACLA_042210* (EAW09999) aus *A. clavatus*, welche eine Sequenz-übereinstimmung von 62 % auf Aminosäureebene aufzeigte.

Zur Amplifikation des Gens *NFIA_062330* wurde die verkürzte Gensequenz verwendet.

Tab. 4-7: Sequenzvergleich auf Aminosäureebene ausgewählter Prenyltransferasen.

	AnaPT	CdpNPT	FgaPT1	FgaPT2	FtmPT1	FtmPT2	7-DMATS	5-DMATS	CTrpPT	CdpC3PT	SirD	FtmPT3	CdpC2PT	EAW21072	EAW09999
AnaPT		32%	25%	31%	30%	32%	30%	32%	32%	32%	27%	28%	33%	24%	22%
CdpNPT			26%	32%	28%	29%	25%	33%	37%	54%	24%	32%	29%	20%	25%
FgaPT1				29%	25%	26%	25%	29%	29%	25%	24%	24%	28%	20%	21%
FgaPT2					36%	37%	31%	52%	34%	35%	31%	30%	30%	22%	22%
FtmPT1						31%	26%	35%	32%	34%	25%	27%	26%	22%	27%
FtmPT2							29%	39%	31%	32%	25%	30%	26%	25%	22%
7-DMATS								28%	29%	32%	35%	26%	30%	22%	22%
5-DMATS									39%	35%	27%	33%	28%	22%	27%
CTrpPT										43%	27%	31%	31%	23%	20%
CdpC3PT											25%	35%	30%	22%	22%
SirD												24%	27%	25%	23%
FtmPT3													26%	22%	25%
CdpC2PT														20%	24%
EAW21072															62%
EAW09999															

FgaPT1 (Accession Nr.: XP_756136), FgaPT2 (AAX08549), 7-DMATS (ABS89001), FtmPT1 (AAX56314), FtmPT2 (ACF22981) und CdpNPT (ABR14712) sind aus *A. fumigatus*; CdpC3PT (EAW17508), AnaPT (EAW16181), CdpC2PT (AGR03830), FtmPT3 (XP_001261274) und EAW21072 (XP_001262969) sind aus *N. fischeri*; 5-DMATS (XP_001269817) und EAW09999 (XP_001271425) sind aus *A. clavatus*; CTrpPT (ADI60056) aus *A. oryzae* und SirD (AAS92554) aus *L. maculans*.

4.1.4.2 Amplifikation von *NFIA_062330* aus gDNA von *N. fischeri* NRRL181

Das Gen *NFIA_062230* enthält keine Introns und konnte daher direkt mit Hilfe des High Fidelity PCR-Kits von Roche von gDNA aus *N. fischeri* NRRL181 amplifiziert werden (Abb. 4-22: Laufspur 1). Durch die Verwendung der Primer KM_042210-1 und KM_042210-2 konnte ein Fragment mit einer Größe von 1373 bp erfolgreich amplifiziert werden. Das verwendete PCR-Programm ist ebenfalls in Abb. 4-22 dargestellt.

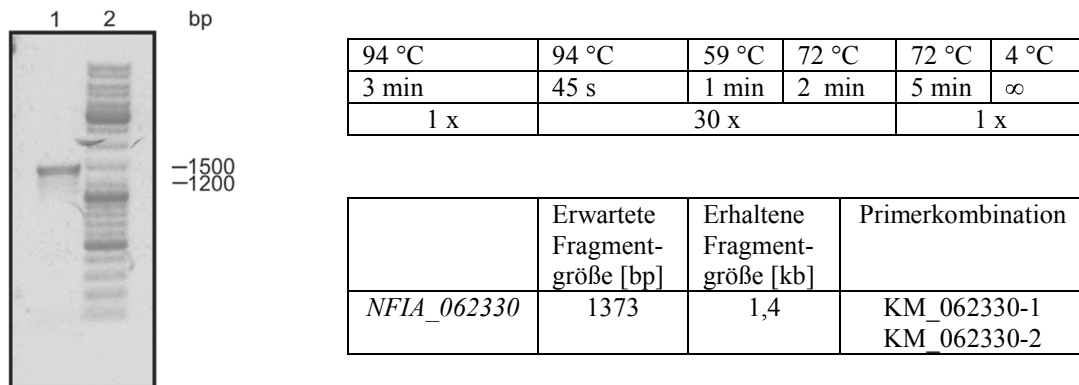


Abb. 4-22: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *NFIA_062330* aus gDNA. Laufspur 1 Amplifikation des vollständigen PCR-Produktes aus gDNA; Laufspur 2: DNA-Größenstandard.

4.1.4.3 Klonierung und Transformation

Nach der Amplifikation des Gens erfolgte die Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy (Abb. 4-23). Die Kontrolle der Klone erfolgte mittels *EcoRI*-Restriktionsverdau und der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 4-23: Laufspur 2).

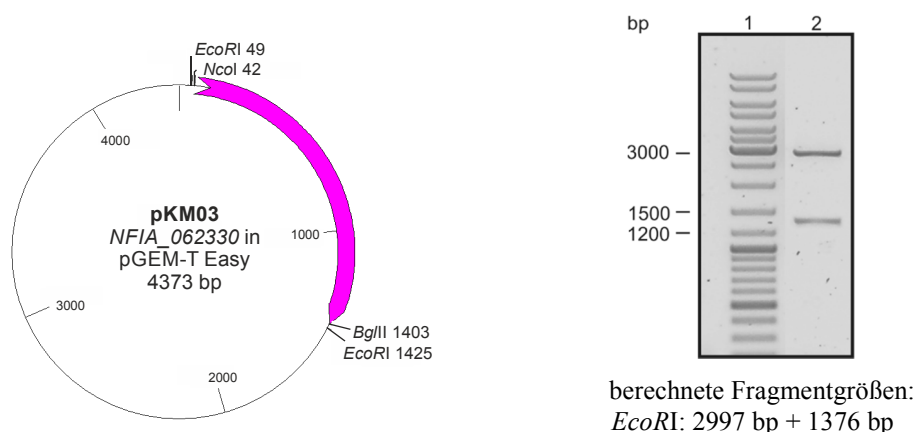


Abb. 4-23: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM03 (*NFIA_062330* in pGEM-T Easy) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind für die Überprüfung sowie für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Das entstandene Klonierungskonstrukt pKM03 wurde für die Umklonierung des Gens mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BglII* geschnitten. Der Expressionsvektor pQE60 wurde mit den

gleichen Enzymen linearisiert. Die Aufreinigung des 1361 bp langen Inserts und des geschnittenen Expressionsvektors erfolgte durch Gelextraktion. Die anschließende Ligation von Insert und Vektor resultierte in dem Expressionskonstrukt pKM14. Die Überprüfung der Plasmid-DNA erfolgte dabei mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* (Abb. 4-24: Laufspur 2).

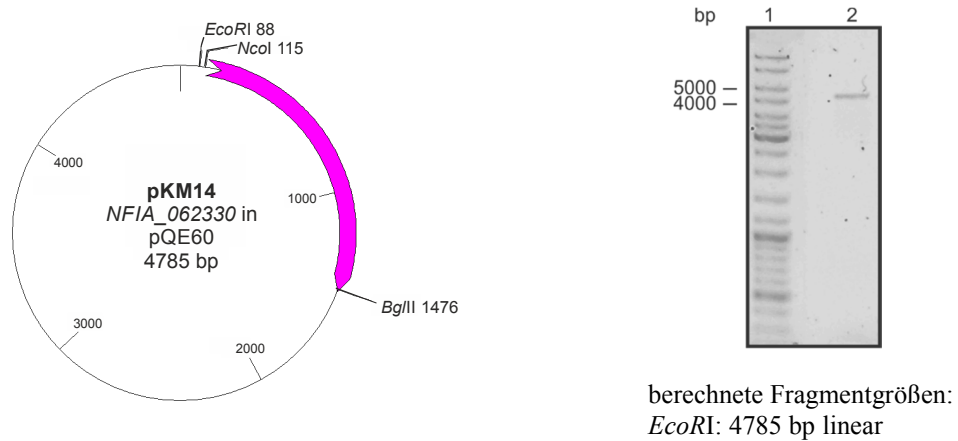


Abb. 4-24: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM14 (*NFIA_062330* in pQE60) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.1.4.4 Überproduktion und Reinigung von EAW21072-His₆

Der Stamm *E. coli* M15 [pREP4] wurde mit dem Expressionskonstrukt pKM14 transformiert. Die Genexpression erfolgte in LB-Medium durch Zugabe von IPTG bei einer Endkonzentration von 0,5 mM für 6 h bei 30 °C und 220 rpm. Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnten 3 mg EAW21072-His₆ aus einem Liter Kultur gewonnen werden. Die Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. 4-25) zeigte für das Protein ein Molekulargewicht von ca. 52 kDa, das mit dem theoretischen Molekulargewicht von EAW21072-His₆ von 52,1 kDa übereinstimmte.

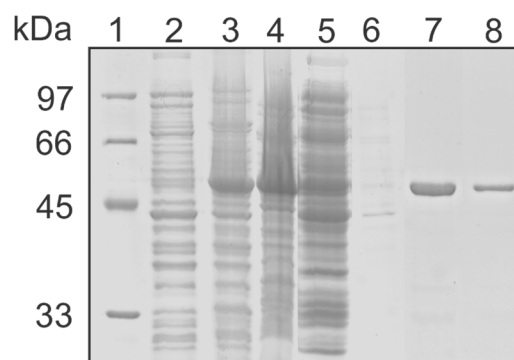


Abb. 4-25: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAW21072-His₆ (pKM14) in *E. coli* M15 [pREP4] Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 6 h Induktion, Spur 4: löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1, Spur 8: Elutionsfraktion 2.

4.1.4.5 Aktivitätstest mit EAW21072

Nachdem das Protein EAW21072-His₆ erfolgreich aufgereinigt werden konnte und das natürliche Substrat für EAW21072 bisher nicht bekannt war, wurden nachstehende Enzymassays mit einer Vielzahl von unterschiedlichen, aromatischen Substraten durchgeführt (Tabelle 4-8). In einem Reaktionsansatz wurden 20 µg EAW21072 in Gegenwart von 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP bzw. GPP oder FPP und 5 mM CaCl₂ mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Enzymassays erfolgte über HPLC. Es konnte jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt mit keinem der getesteten Substrate eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen hierfür werden im Kapitel 5.4 diskutiert. Um eine mögliche Enzyminaktivität nachzuweisen, wurde ebenfalls das orthologe Gen *ACLA_042210* aus *A. clavatus* NRRL1 (Kapitel 4.1.5) nachstehend untersucht.

Tabelle 4-8: Übersicht über die getesteten Substrate für EAW21072

Substrat		Substrat	
Aromatische Aminosäuren	L-Trp	Xanthonderivate	1,3,6-Trihydroxyxanthon
	L-Tyr		1,3,7-Trihydroxyxanthon
	D-Tyr		1,3-Dihydroxyxanthon
Naphtalinderivate	1-Naphtol		1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon
	2-Naphtol		3-Hydroxy-9-xanthon
	1,2-Dihydroxynaphtalen		Xanthon
	1,3-Dihydroxynaphtalen		Xanthydrol
	1,4-Dihydroxynaphtalen		2,8-Dihydroxy-1,3-dimethylxanthon
	1,5-Dihydroxynaphtalen	Zyklische Peptide	cyclo-L-Trp-L-Trp
	1,6-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Leu
	1,7-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Tyr
	2,3-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-His
	2,6-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Phe
	2,7-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Pro
	1,4-Dihydroxy-2-naphtoat		cyclo-L-Trp-Gly
	3,5-Dihydroxy-2-naphtoat	Andere mögliche Substrate	(S)-Benzodiazepindion
	3,7-Dihydroxy-2-naphtoat		(R)-Benzodiazepindion
Indolderivate	5-Amino-1-naphtol		cyclo-L-Tyr-Ant-Ant
	8-Amino-2-naphtol		cyclo-L-Tyr-Ant
	5,8-Dihydroxy-1,4-napthochinone		Verruculogen
	L-β-Homotryptophan		Anthrachinon Dioxim (AQD)
	Indol-3-propionsäure		Butyrolacton
	Indol-3-pyruvat		Roquefortin C
	Indol-3-butyrat		ATP
	L-Tryptamin		Adenin
	5-Methyl-DL-Trp		Guanin
	7-Methyl-DL-Trp		3,7-Dimethyl-1,9-Dibenzofurandiol
	5-Hydroxy-L-Trp		Xanthin
			Paxilin

4.1.5 Analysen zur putativen Prenyltransferase *ACLA_042210* aus *A. clavatus* NRRL1

4.1.5.1 Einleitung

Das Gen *ACLA_042210* befindet sich auf dem Contig 83 im Genom von *A. clavatus* NRRL1 (Sequenz in GenBank mit der Accesion Nr. NW_001517097) und besitzt eine postulierte Größe von 1468 bp (NCBI-Datenbank: 261, 2667 bp bis 261,4133) und ein abgeleitetes Protein (EAW09999) mit 490 Aminosäuren. Nach Sequenzvergleich mit bereits bekannten Prenyltransferasen auf Aminosäureebene und durch die Verwendung des Programmes FGESH, wurde die vorhergesagte Gensequenz von *ACLA_042210* abgeändert (Anhang 7.1.1.4). Eine verkürzte Sequenz mit einer Gengröße von 1362 bp (216,976 bp bis 218,337 bp) und einem abgeleiteten Genprodukt von 454 Aminosäuren wurde für den weiteren Sequenzvergleich verwendet. Die Analyse von *ACLA_042210* zeigte, dass es 62 % Sequenzübereinstimmung mit dem Gen *NFIA_062330* aus *N. fischeri* NRRL181 auf Aminosäureebene aufweist und es sich hierbei wahrscheinlich um zwei orthologe Gene handelt (Abb.4-26).

EAW21072	1	MTIPSIPETIPEHSEL-KGKAPLRDISGIPANPRQTIRTPSWDLTSTWLIGANDDIRTWW	59
EAW09999	1	MTAPSIPETIPENAELPKGKTPIR---GVPHTP---THTSSWDLTSTWLVGANEHVRAWW	54
EAW21072	60	DCIGPQVAILADEAGYSVAAQTEIILLLLHSHVLPDMGRFPFAGQNKPAVQYSWKINTDDY	119
EAW09999	55	DALGPQIASLADEAGYKMLAQTEIILLLLHSHVLLPHLGRYPPPI-QEKAPVEYRWTCTGDEH	113
EAW21072	120	DH----PILTLTVEAPGEHAKGSSSMIRHHLQATQNIVEQLAAQLPPVDLTWYRHFVSAF	175
EAW09999	114	DHEHDHPTLTLAIEAAGD-AKSTSHLTRHHLQATQQILELLASQLPSVSLRWYRHFVQAF	172
EAW21072	176	QIDHHTDHSSSHRTFLSTDKDTRPRMPLSFEDTDTGVIPKVYFYPPAHAHESKPSLSIF	235
EAW09999	173	HIDHHMDHSSHRSSRHTDAD--RPRTPLAFEFADTGVVPRVYFSPPAQAQEEKPSLAIF	230
EAW21072	236	TDAIRPISETNPLPAFEEVVAFDNHPVGVTNLNPEMLGMDCIAPAQASLYLHASTPVTNF	295
EAW09999	231	TDAIRPLSESVSLLAFEEFVAFVDNHPVGVTLTPEVLGVDCAA-ASASLYLHAHTPLTNF	289
EAW21072	296	ESIIAVMTLGGRVHTMDMAIMELWELLCLVLQPKHRDRMFSWGDDLPVWNAHAQGDEEQG	355
EAW09999	290	ESVIAILTLGGRVHGRDLAIMELWELLCAMLRKLVNRTFSWGDELP---GREREDWHQG	346
EAW21072	356	LKYCFEILPGAGVPEVTLYIPVVRYPAGEDMAVGLERFLKKRGQAQFADGFWRVNLMLS	415
EAW09999	347	LYRCFEIMPEREVPEVSVDIPVAGYG-RDEDVLVGLKFLKNRGQKPCAEGLARVVHMLR	405
EAW21072	416	EGWTDSSRRVVTHIACSFREGSLDVTSCLEPAILRSRDE	455
EAW09999	406	RGKTEHQPVLTTHIVCSLQGGVLKVTSCMEPGLKQQYGE	445

Abb. 4-26: Aminosäuresequenzvergleich der Proteine EAW21072 aus *N. fischeri* NRRL181 und EAW09999 aus *A. clavatus* NRRL1.

Die Analyse der benachbarten Gene von *ACLA_042210* (Abb. 4-27) zeigte weder signifikanten Identitäten zu bereits identifizierten Biosynthese-Genclustern auf, noch zu den Genen in der Nachbarschaft von *NFIA_062330*.

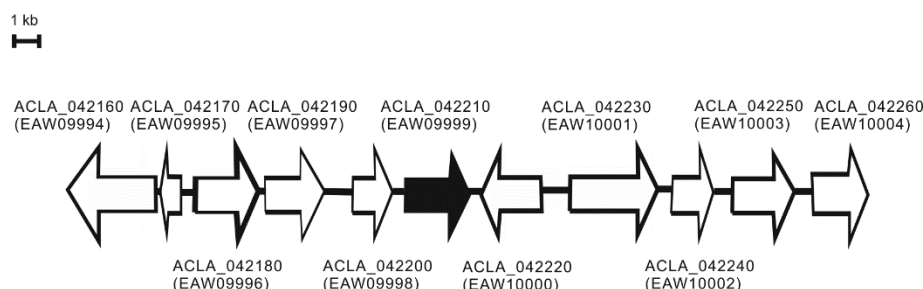


Abb. 4-27: graphische Darstellung von *ACLA_042210* mit benachbarten Genen

Auch Sequenzvergleiche der einzelnen Gene auf Aminosäureebene durch BlastP konnten leider keine Rückschlüsse auf ein putatives Gencluster geben (Tab. 4-9).

Tab. 4-9: Sequenzanalysen auf Aminosäureebene von *ACLA_042210* und benachbarter Gene.

Gen	Protein	Lokalisation (bp)	Größe (aa)	putative Funktion
<i>ACLA_042160</i>	EAW09994	2604800-2606704	634	Lysophospholipase
<i>ACLA_042170</i>	EAW09995	2606901-2607072	50	hypothetisches Protein
<i>ACLA_042180</i>	EAW09996	2607386-2608783	465	hypothetisches Protein
<i>ACLA_042190</i>	EAW09997	2609162-2610356	372	Oxidoreduktase
<i>ACLA_042200</i>	EAW09998	2611368-2612087	239	α -Acetolactat Decarboxylase
<i>ACLA_042210</i>	EAW09999	2612667-2614133	392	Prenyltransferase der DMATS Superfamilie
<i>ACLA_042220</i>	EAW10000	2614758-2616164	488	Integral Membran Protein
<i>ACLA_042230</i>	EAW10001	2616907-2618827	555	Carboxylesterase
<i>ACLA_042240</i>	EAW10002	2619490-2620437	315	Dehydrogenase
<i>ACLA_042250</i>	EAW10003	2621012-2622408	389	Protein Kinase Domän Protein
<i>ACLA_042260</i>	EAW10004	2622995-2624169	358	Esterase/Lipase

Der Vergleich mit identifizierten Prenyltransferasen auf Aminosäureebene zeigte keine signifikanten Identitäten auf (Tab. 4-7). Es konnten aber Identitäten von 27 % mit FtmPT1 aus *A. fumigatus* (Grundmann & Li 2005), 25 % mit CdpNPT aus *N. fischeri* NRRL181 (Yin *et al.*, 2010), 25 % mit FtmPT3 (Mundt *et al.*, 2012) und 24 % mit CdpC2PT aus *N. fischeri* NRRL181 (Mundt & Li S.-M. 2013) auf Aminosäureebene nachgewiesen werden. Zur Amplifikation des Gens *ACLA_042210* wurde die geänderte Gensequenz verwendet.

4.1.5.2 Amplifikation von *ACLA_042210* aus gDNA von *A. clavatus* NRRL1

Das Gen *ACLA_042210* wurde direkt von gDNA aus *A. clavatus* NRRL1 mit Hilfe des High Fidelity PCR-Kits von Roche amplifiziert. Die Amplifikation des Gens erfolgte durch die Primerkombination KM_042210-1 und KM_042210-2 (Abb. 4-28: Laufspur 2). Durch den Primer KM_042210-2 wurde das enthaltene Stopcodon für eine spätere Aufreinigung mittels Histidin-tag mutiert. Wie auf dem Agarosegel in Abb. 4-28 zu beobachten, war die Amplifikation erfolgreich.

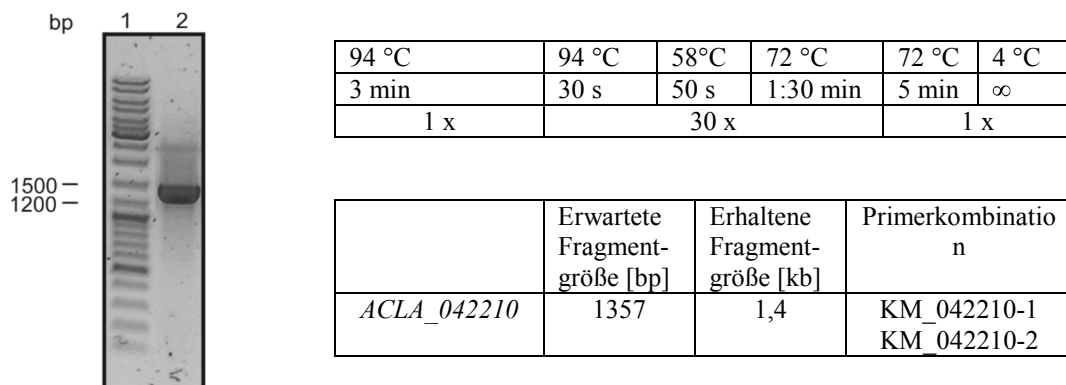


Abb. 4-28: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *ACLA_042210* aus gDNA. Laufspur 1: Amplifikation des vollständigen PCR-Produktes aus gDNA; Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

4.1.5.3 Klonierung und Transformation

Das resultierende 1357 bp große Fragment wurde anschließend in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy eingebracht und die erhaltenen Klone mittels *EcoRI* überprüft (Abb. 4-29: Laufspur 2). Das positive Konstrukt wurde als pKM18 bezeichnet (Abb. 4-29).

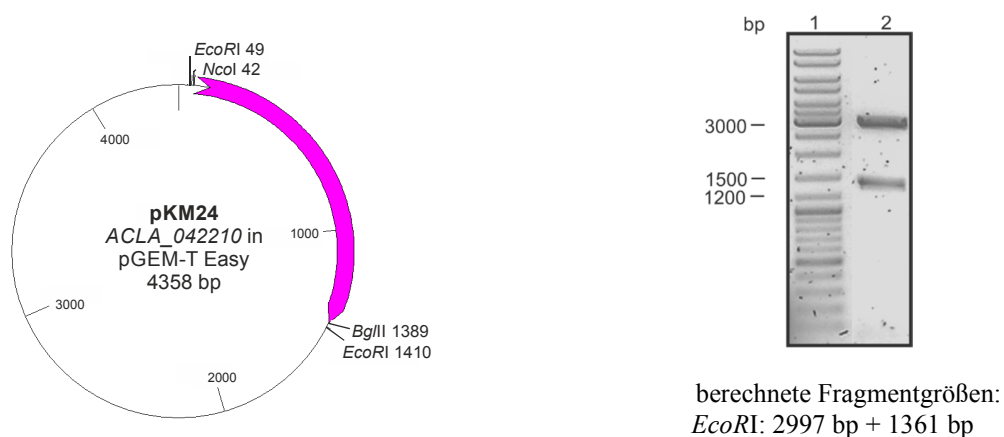
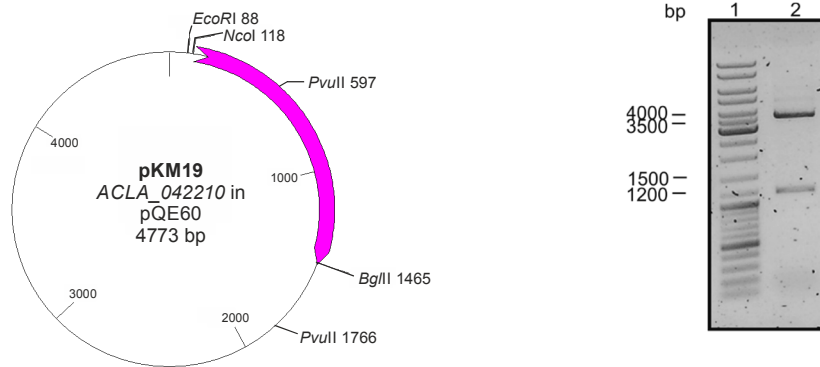


Abb. 4-29: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM18 (*ACLA_042210* in pGEM-T Easy) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind für die Überprüfung sowie für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Zum Erstellen des Expressionskonstrukts wurde pKM18 durch die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BglII* geschnitten. Das resultierende 1347 bp große Fragment wurde über Gelextraktion gewonnen und mit dem zuvor geschnittenen *NcoI*-*BglII* Fragment des Expressionsvektors pQE60 ligiert. Die Kontrolle der Plasmide erfolgte mit dem Restriktionsenzym *PvuII* (Abb. 4-30: Laufspur 2). Das erhaltene Konstrukt wurde als pKM19 benannt.



berechnete Fragmentgrößen:
PvuII: 3604 bp + 1169 bp

Abb. 4-30: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM19 (*ACLA_042210* in pQE60) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.1.5.4 Überproduktion und Reinigung von EAW09999-His₆

Das Konstrukt pKM19 wurde in den Stamm *E. coli* M15 [pREP4] transformiert und nach Induktion mit 0,1 mM IPTG für 6 h und 220 rpm bei 30 °C inkubiert. Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie konnten 6 mg EAW09999-His₆ aus einem Liter Kultur aufgereinigt werden. Die Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. 4-31) zeigte für das Protein ein Molekulargewicht von ca. 52 kDa, das mit dem theoretischen Molekulargewicht von EAW09999-His₆ von 50,7 kDa übereinstimmte.

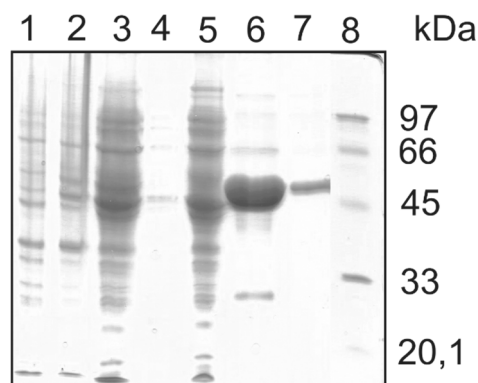


Abb. 4-31: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAW09999-His₆ (pKM19) in *E. coli* M15 [pREP4] Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 6 h Induktion, Spur 4: löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1, Spur 8: Elutionsfraktion 2.

4.1.5.5 Aktivitätstest mit EAW09999

Da für EAW09999 bislang kein natürliches Substrat bekannt war und zudem keins postuliert werden konnte, wurde eine Vielzahl von Enzymassays mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt (Tab. 4-10). In einem Reaktionsansatz wurden 20 µg EAW09999 in Gegenwart von 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP bzw. GPP oder FPP und 5 mM CaCl₂ mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Untersuchung der Enzymassays erfolgte über HPLC. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte mit den getesteten Substraten keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen hierfür werden im Kapitel 5.4 diskutiert.

Tab. 4-10: Übersicht über die getesteten Substrate für EAW09999

Substrat		Substrat	
Aromatische Aminosäuren	L-Trp	Xanthonderivate	1,3,6-Trihydroxyxanthon
	L-Tyr		1,3,7-Trihydroxyxanthon
	D-Tyr		1,3-Dihydroxyxanthon
Naphtalinderivate	1-Naphtol		1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon
	2-Naphtol		3-Hydroxy-9-xanthon
	1,2-Dihydroxynaphtalen		Xanthon
	1,3-Dihydroxynaphtalen		Xanthydrol
	1,4-Dihydroxynaphtalen		2,8-Dihydroxy-1,3-dimethylxanthon
	1,5-Dihydroxynaphtalen	Zyklische Peptide	cyclo-L-Trp-L-Trp
	1,6-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Leu
	1,7-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Tyr
	2,3-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-His
	2,6-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Phe
	2,7-Dihydroxynaphtalen		cyclo-L-Trp-L-Pro
	1,4-Dihydroxy-2-naphtoat		cyclo-L-Trp-Gly
	3,5-Dihydroxy-2-naphtoat		(S)-Benzodiazepindion
	3,7-Dihydroxy-2-naphtoat		(R)-Benzodiazepindion
	5-Amino-1-naphtol	Andere mögliche Substrate	cyclo-L-Tyr-Ant-Ant
Indolderivate	8-Amino-2-naphtol		cyclo-L-Tyr-Ant
	5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinone		Verruculogen
	L-β-Homotryptophan		Anthrachinon Dioxim (AQD)
	Indol-3-propionsäure		Butyrolacton
	Indol-3-pyruvat		Roquefortin C
	Indol-3-butytrat		ATP
	L-Tryptamin		Adenin
	5-Methyl-DL-Trp		Guanin
	7-Methyl-DL-Trp		3,7-Dimethyl-1,9-Dibenzofurandiol
	5-Hydroxy-L-Trp		Xanthin
			Paxilin

4.2 Analysen zur putativen Aminooxidase NFIA_043660 aus *N. fischeri*

4.2.1 Sequenzanalysen von NFIA_043660

Durch vorherige Analysen konnte bereits die Prenyltransferase CdpC2PT codierend durch NFIA_043650 aus *N. fischeri* NRRL181 biochemisch charakterisiert werden (Kapitel 4.1.3, Mundt & Li S.-M. 2013). CdpC2PT katalysiert dabei unter anderem die zweifache Prenylierung von cyclo-L-Trp-L-Trp, resultierend in zwei Produkten mit einer reversen Mono- und Diprenylierung an Position C-2 des Indolrings. Der Vergleich mit bereits bekannten isolierten Naturstoffen zeigte das Vorkommen von sogenannten Fellutaninen basierend auf der Struktur von 2 Tryptophan Molekülen. Die Fellutanine A, B, C und D wurden aus dem Pilz *P. fellutanum* (Kozlovsky *et al.*, 2001b) isoliert. Die Stereochemie der Struktur Fellutanin D wurde später durch die eigene Arbeitsgruppe revidiert (Kozlovsky *et al.*, 2001a). Fellutanin B zeigt dabei eine reverse Monoprenylierung und Fellutanin C eine reverse Diprenylierung an Position C-2 des Indolrings auf. Das Endprodukt Fellutanin D ist hingegen durch zwei zusätzliche Bindungen zwischen dem Indol- und dem Diketopiperazinring gekennzeichnet. Um herauszufinden inwiefern *N. fischeri* NRRL181 für die Biosynthese von Fellutaninen verantwortlich ist, erfolgte eine Analyse der Gene innerhalb des putativen Genclusters mit *cdpC2PT* (Kapitel 4.1.3: Abb. 4-11). Dabei konnten direkt neben der Prenyltransferase eine nichtribosomalen Peptidsynthetase NFIA_043670 und eine putative Aminooxidase NFIA_043660 festgestellt werden. Nachstehend sollte nun die Funktion der putativen Aminooxidase (NFIA_043660) innerhalb der Fellutanin D-Biosynthese untersucht werden.

Die NCBI-Annotierung ergab ein Gen mit einer Größe von 1813 bp (Sequenz in GenBank unter Accession Nr.: NW_001509774; 32,968 – 34,780 bp), jedoch ein verkürztes mRNA-Transkript mit einer Größe von 1395 bp (Accession Nr.: XP_001267443), resultierend in einen abgeleiteten Genprodukt von 464 Aminosäuren. Die Annotierung des *Aspergillus Broad Institutes* wies hingegen das Gen NFIA_043660 auf dem Contig 568 mit einer Gesamtgröße von 1395 bp (464 Aminosäuren) ohne ein enthaltenes Intron auf (Accession Nr.: NW_001509774; 33,178 – 34,572 bp). Daraufhin erfolgte die Analyse der Intron-Exon-Struktur mit Hilfe des Programmes FGENESH. Es wurde eine verkürzte Gensequenz mit einer Größe von 1107 bp (369 Aminosäuren) bestehend aus 2 Exons (Exongrößen: 1039/68 bp) und 1 Intron (Introngröße: 64 bp) vorhergesagt.

Für die Amplifikation des Gens NFIA_043660 wurde die Gensequenz mit einer Größe von 1395 bp verwendet. BlastP-Analysen von EAW25547 (464 Aminosäuren) zeigten eine enthaltene NAD-Bindungsdomäne und signifikante Sequenzidentitäten zu anderen Aminooxidasen auf.

Es konnten Identitäten von 59 % zu EAL86183 von *A. fumigatus* Af293, 46 % zu BAE1441 aus *A. oryzae* RIB40 und 46 % zu EED47847 aus *A. flavus* NRRL3357 auf Aminosäureebene festgestellt werden.

4.2.2 Amplifikation von *NFIA_043660* aus gDNA von *N. fischeri* NRRL181

Das Gen *NFIA_043660* wurde von gDNA aus *N. fischeri* NRRL181 mit Hilfe des High Fidelity PCR-Kits von Roche amplifiziert. Um die Expression mittels pQE60 durchzuführen, wurden durch die Primer *NFIA_043660*-1 und *NFIA_043660*-2 die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bgl*II eingebracht (Abb. 4-32 A: Laufspur 2; Kapitel 3.2.2, Tab. 3-7). Für eine Expression mit pHIS8, wurde das Gen hingegen mit den Primer *NFIA_043660*-3 und *NFIA_043660*-4 amplifiziert, welche die Restriktionsschnisstellen *Bam*HI und *Xho*I (Abb. 4-32 B: Laufspur 2) inserierten. Durch den verwendeten Primer *KM_043660*-2 wurde das enthaltene Stopcodon für eine spätere Aufreinigung mittels Histidin-*tag* mutiert. Zur Bestätigung der Intron-Vorhersage erfolgte ebenfalls die Amplifikation von cDNA mittels der Primerkombination *KM_043660*-1 und *KM_043660*-2 und die anschließende Sequenzierung des resultierenden Klonierungskonstruktes (Abb. 4-32 C: Laufspur 1). Wie auf den Agarosegelen in Abb. 4-32 zu beobachten, war die Amplifikation von gDNA und cDNA erfolgreich.

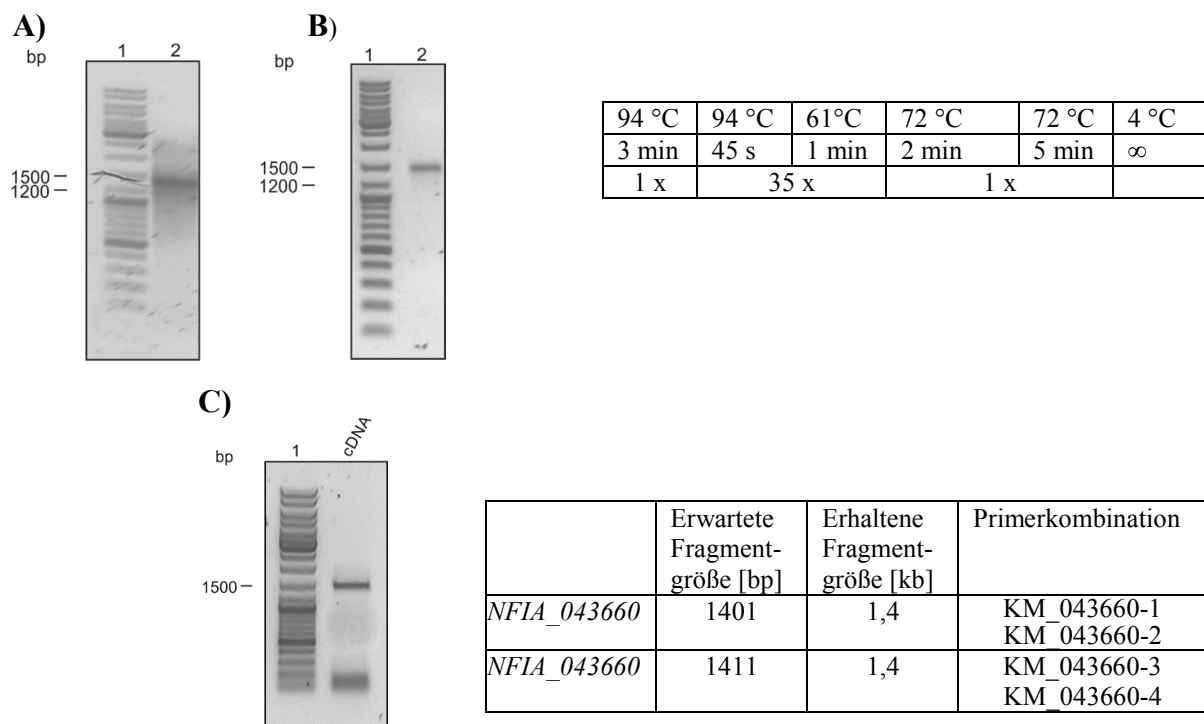
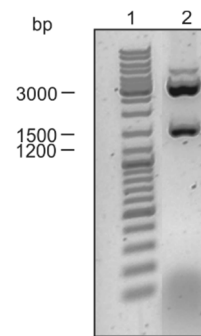
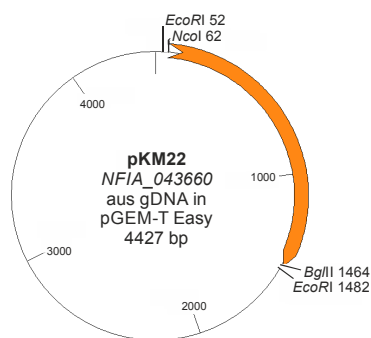


Abb. 4-32: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *NFIA_043660* aus gDNA und cDNA. A) Laufspur 2: PCR-Produkt von *NFIA_043660* aus gDNA für die Klonierung mit pQE60; B) PCR-Produkt von *NFIA_043660* aus gDNA für die Klonierung mit pHIS8; C) PCR-Produkt von *NFIA_043660* aus cDNA; Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

4.2.3 Klonierung und Expression in *E. coli* M15, SG13009, XL1-Blue MRF⁺

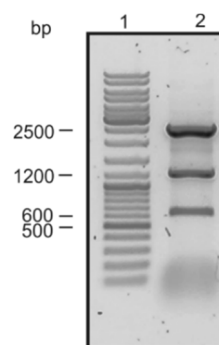
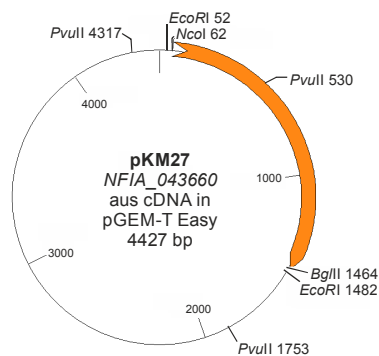
Die erhaltenen PCR-Fragmente von *NFIA_043660* (Abb. 4-32 B und C) wurden in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy eingebracht. Die Kontrolle der Klone, erhalten aus der gDNA Amplifikation, erfolgte mittels des Restriktionsenzym *EcoRI* (Abb. 4-33 A). Im Vergleich dazu wurden die Klone, welche nach der cDNA-Amplifikation erworben wurden, durch das Enzym *PvuII* analysiert (Abb. 4-33 B). Jeweils ein Klon mit dem richtigen Restriktionsmuster wurde anschließend sequenziert und die enthaltene Gensequenz als fehlerfreie Basensequenz von *NFIA_043660* identifiziert. Die resultierenden Konstrukte wurden als pKM22 (gDNA) und pKM27 (cDNA) bezeichnet.

A)



berechnete Fragmentgrößen:
EcoRI: 2997 bp + 1430 bp

B)



berechnete Fragmentgrößen:
PvuII: 2564 bp + 1223 bp + 640 bp

Abb. 4-33: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung von A) pKM22 (*NFIA_043660* in pGEM-T Easy aus gDNA) und B) pKM27 (*NFIA_043660* in pGEM-T Easy aus cDNA) mit zugehörigen Vektorkarten. Dargestellt sind für die Überprüfung sowie für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Für eine spätere Umklonierung in den Expressionsvektor wurde das Plasmid pKM22 mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bgl*II verdaut. Das 1402 bp lange *Nco*I/*Bgl*II-Fragment wurde über eine Gelextraktion aufgereinigt (Kapitel 3.6.6) und in den ebenfalls mit *Nco*I und *Bgl*II verdauten pQE60-Vektor ligiert. Dadurch entstand das Expressionskonstrukt pKM23, welches mittels *Eco*RI-Verdaus kontrolliert wurde (Abb. 4-34).

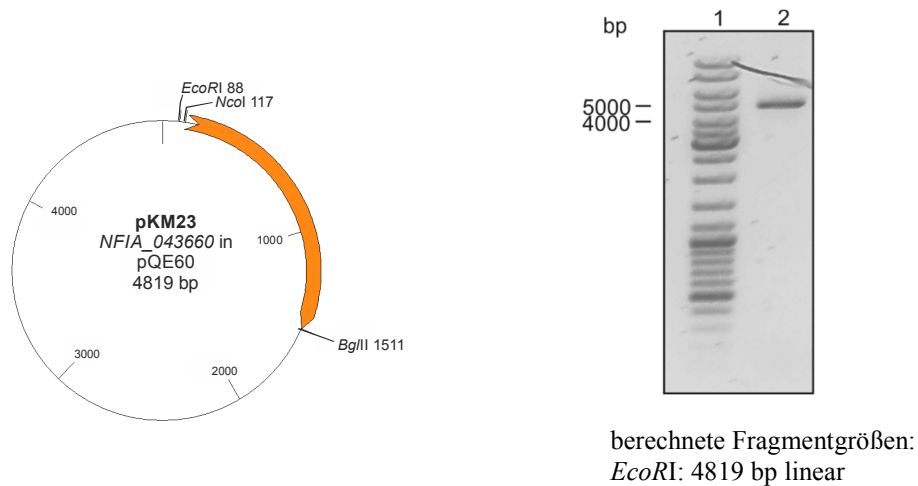


Abb. 4-34: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM23 (NFIA_043660 in pQE60) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Das Plasmid pKM23 wurde mittels Hitzeschock-Transformation in *CaCl*₂-kompetente *E. coli* Stämme (M15, X11-Blue MRF^c, SG13009) eingebracht. Die Abb. 4-35 zeigt die SDS-PAGE einer Aufreinigung des Proteins in *E. coli* SG-Zellen nach der Kultivierung bei 37 °C in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 und Induktion mit 0,2 mM IPTG für 16 h bei 22 °C.

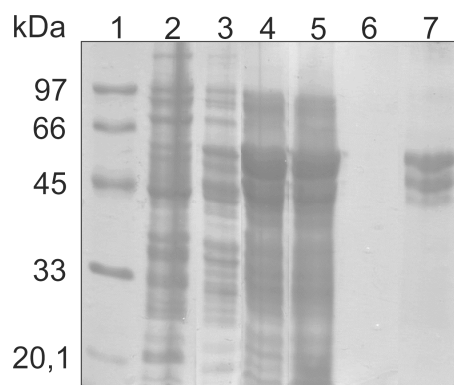


Abb. 4-35: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAW25547-His₆ (pKM23) in *E. coli* SG13009 Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 16 h Induktion, Spur 4: löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1.

Wie in der Abb. 4-35 zu beobachten ist, konnte in der Elutionsfraktion von EAW25547-His₆ eine Proteinbande oberhalb der 45 kDa Bande des Proteingrößenstandards beobachtet werden. Die Größe von ca. 55 kDa stimmte dabei mit dem berechneten Molekulargewicht von 52,5 kDa

überein. Um die Aktivität des aufgereinigten Proteins zu überprüfen, wurden Enzymassays mit verschiedenen Parametern durchgeführt. Dabei wurde EAW25547-His₆ mit den isolierten Produkten von CdpC2PT und cyclo-L-Trp-L-Trp inkubiert, sowie Tandeminkubationen von cyclo-L-Trp-L-Trp in Anwesenheit von CdpC2PT untersucht. Die Vorhersage der

Proteinstruktur durch NCBI deutete auf eine Flavin enthaltene Aminooxidase mit Rossmann-Typ NAD(P)-Bindedomäne hin. Diesbezüglich wurden die getesteten Substrate jeweils mit verschiedenen Kombinationen an Kofaktoren für 16 h bei 37 °C inkubiert (Abb. 4-36). Dabei wurden die folgenden Möglichkeiten untersucht: + FMN / + NADPH, + FAD / + NADPH, + FMN / - NADPH, + FAD / - NADPH und ohne die Zugabe von Kofaktoren. Wie in Abb. 4-36 zu erkennen ist, konnte leider keine Produktbildung durch EAW25547-His₆ bei allen getesteten Substraten beobachtet werden. Als Negativkontrolle diente der jeweilige Enzymassay ohne die Zugabe von Kofaktoren.

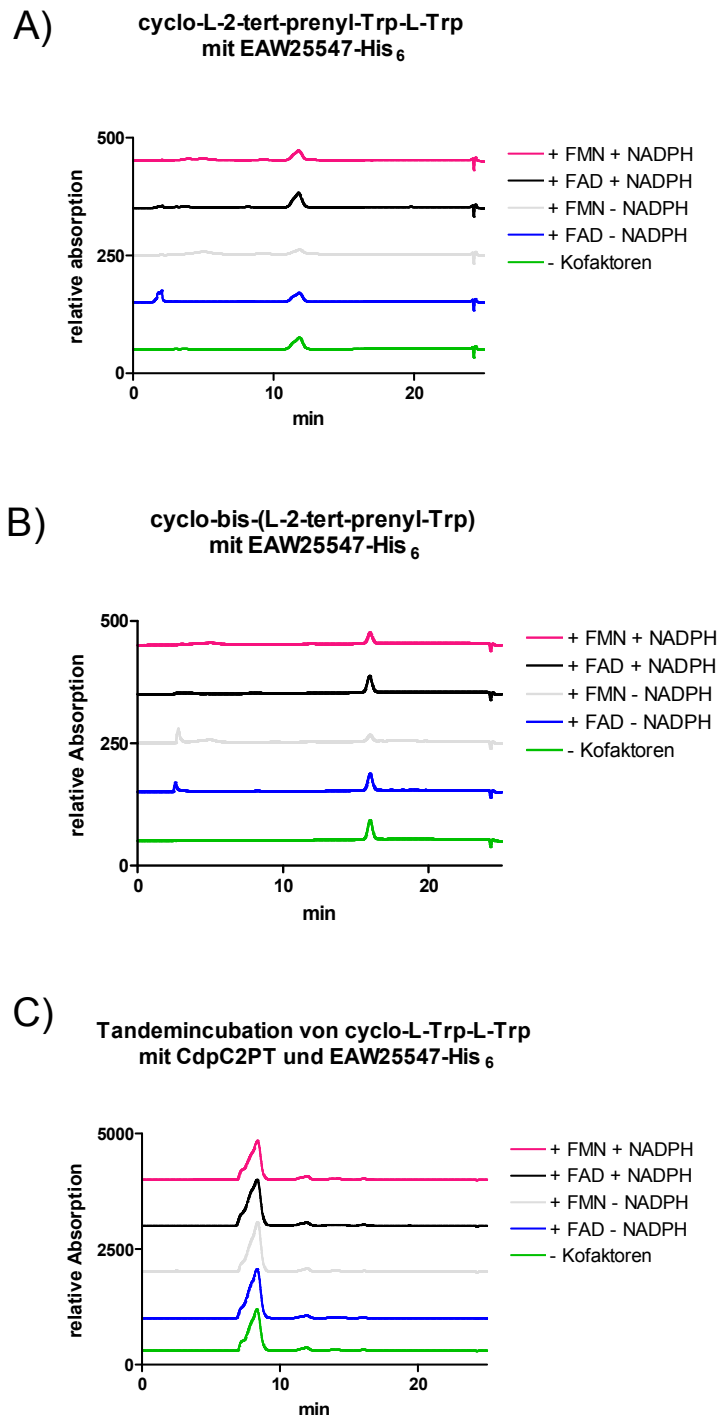


Abb. 4-36: HPLC-Chromatogramme der Enzymassays von EAW25547-His₆ mit A) cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp, B) cyclo-bis-(L-2-tert-prenyl-Trp) und C) Tandeminkubation mit cyclo-L-Trp-L-Trp und cdpC2PT. Die Enzymassays wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Rot) +FMN/+NADPH, Schwarz) + FAD/+ NADPH, Grau) + FMN/- NADPH, Blau) +FAD/- NADPH und Grün) ohne Kofaktoren.

Um zu untersuchen ob es sich bei der aufgereinigten Bande tatsächlich um EAW25547-His₆ handelt, wurde der Leervektor pQE60 als Negativkontrolle unter den gleichen Bedingungen mit aufgereinigt. Die Abb. 4-37 zeigt die SDS-PAGE der Aufreinigung des Proteins in *E. coli* SG-Zellen mit der Negativkontrolle (pQE60-Leervektor) nach der Kultivierung bei 37 °C in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 und Induktion mit 0,2 mM IPTG für 16 h bei 22 °C.

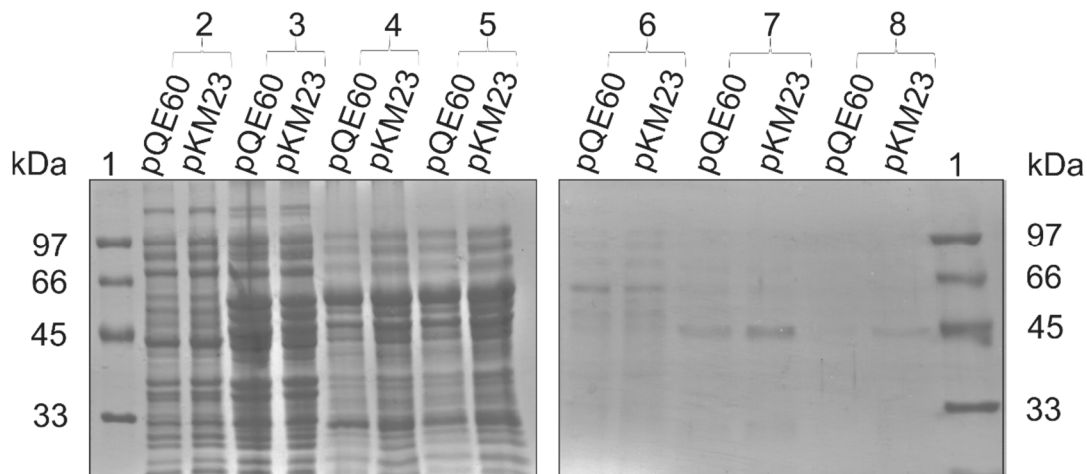


Abb. 4-37: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAW25547-His₆ (pKM23) mit pQE60-Leervektor in *E. coli* SG13009 Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 16 h Induktion, Spur 4: löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1, Spur 8: Elutionsfraktion 2.

Vergleicht man die Laufspuren 1 mit 2 und 3, konnte keine Bande für EAW25547-His₆ oberhalb der 45 kDa-Bande des Proteingrößenstandards beobachtet werden. Die Laufspuren 7 und 8 enthielten jedoch eine Proteinbande bei 45 kDa. Da diese Bande jedoch auch in der Negativkontrolle (pQE60-Leervektor) vorzufinden war, kann dieses nicht von dem Protein EAW25547-His₆ stammen. Um eine mögliche Expression von EAW25547-His₆ in der Membranfraktion nicht auszuschließen wurden außerdem der Rohextrakt und Zellextrakt vom pKM23-Konstrukt und von der Negativkontrolle (pQE60-Leervektor) untersucht (Abb. 4-38). Auch hierbei zeigten pQE60 und pKM23 die gleichen Proteinbanden auf und somit konnte keine Überexpression des gesuchten Proteins nachgewiesen werden.

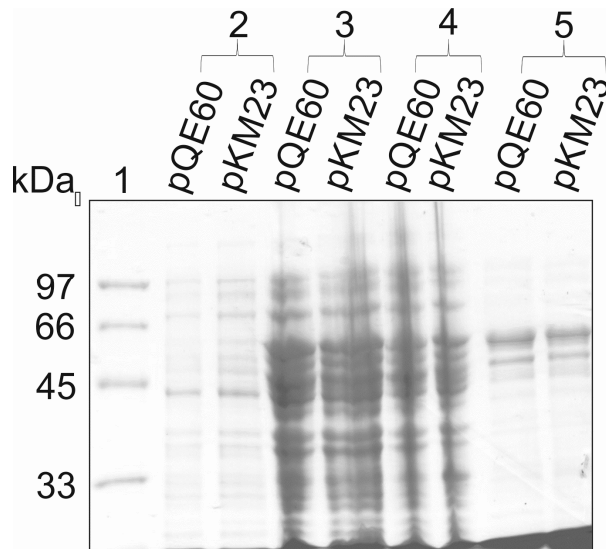


Abb. 4-38: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAW25547-His₆ (pKM23) in *E. coli* SG13009 Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 16 h Induktion, Spur 4: Rohextrakt, Spur 5: Zelleextrakt.

Die Tab. 4-11 listet weitere untersuchte Expressionsbedingungen von EAW25547-His₆ (pKM23) in *E. coli* XL1-Blue bzw. *E. coli* M15 [pREP4] bzw. *E. coli* SG13009 [pREP4] auf. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigten vergleichbare Ergebnisse zu Abb. 4-37.

Tab. 4-11: Getestete Expressionsbedingungen von EAW25547-His₆ (pKM23) in *E. coli* XL1-Blue bzw. *E. coli* M15 bzw. *E. coli* SG13009.

<i>E. coli</i> Stamm	Medium	Induktion	Temperatur [°C]	Inkubationsdauer [h]
XL1-Blue MRF⁺ M15 [pREP4]	100 ml LB	0,3 mM IPTG	30	3
	100 ml LB	0,2 mM IPTG	30	6
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	30	6
	100 ml LB	0,3 mM IPTG	30	16
	100 ml LB	0,2 mM IPTG	30	16
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	30	16
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	37	6
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	37	6
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	37	16
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	37	16
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	20	6
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	20	6
	100 ml LB	0,2 mM IPTG	20	16
	100 ml LB	1,0 mM IPTG	20	16
SG13009 [pREP4]	100 ml LB	0,2 mM IPTG	37	16
	100 ml LB	1,0 mM IPTG	37	16

4.2.4 Klonierung und Expression in *E. coli* BL21 (DE3)

Das durch die Primer NFIA_043660-3 und NFIA_043660-4 erfolgreich amplifizierte Fragment wurde mit einer Größe von 1411 bp in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy eingebracht. Das so entstandene Konstrukt pKM24 wurde erst anhand eines *EcoRI*-Verdaus untersucht (Abb. 4-39) und die enthaltene Sequenz durch Sequenzierung bestätigt.

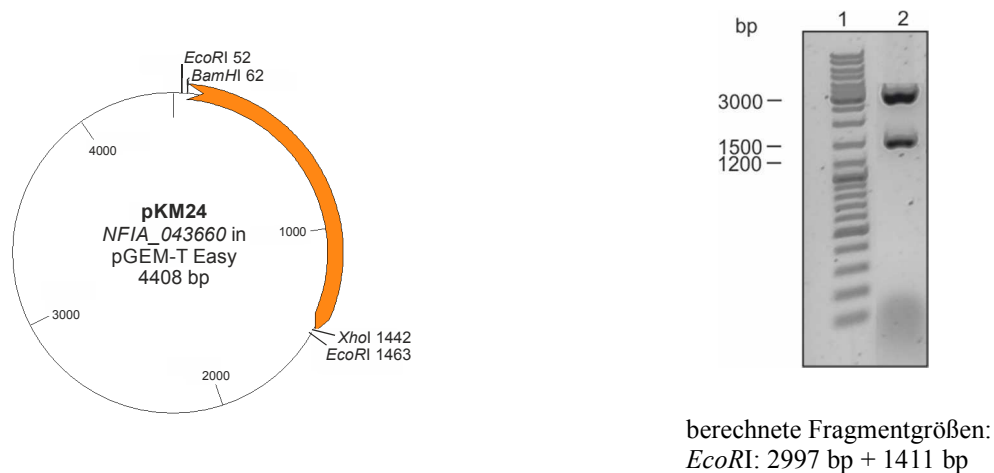


Abb. 4-39: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM24 (NFIA_043660 in pGEM-T Easy aus gDNA) mit der zugehörigen Vektorkarte. Dargestellt sind für die Überprüfung sowie für die Umklonierung in den Expressionsvektor wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Das Klonierungskonstrukt pKM24 wurde im Folgendem durch *BamHI* und *XhoI* geschnitten und das resultierende 1401 bp große Fragment nach entsprechender Aufreinigung über Gelextraktion in den Expressionsvektor pHIS8 ligiert, der zuvor ebenfalls mit gleichen Restriktionsenzymen behandelt wurde.

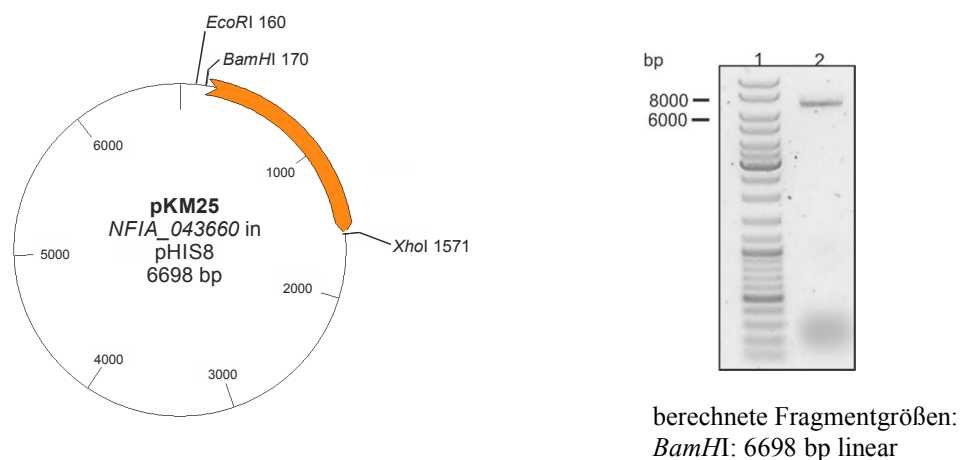


Abb. 4-40: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM25 (NFIA_043660 in pHIS8) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen

Das so durch entstandene Konstrukt (pKM25) wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bam*HI überprüft (Abb. 4-40). Das Expressionskonstrukt pKM25 wurde mittels Hitzeschock-Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen eingebracht. Die Abb. 4-41 zeigt die SDS-PAGE einer Aufreinigung des Proteins in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit nach der Kultivierung bei 37 °C in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 und Induktion mit 0,5 mM IPTG für 6 h bei 20 °C. Das theoretische Molekulargewicht von His₈-EAW25547 wurde mit 52,7 kDa berechnet.

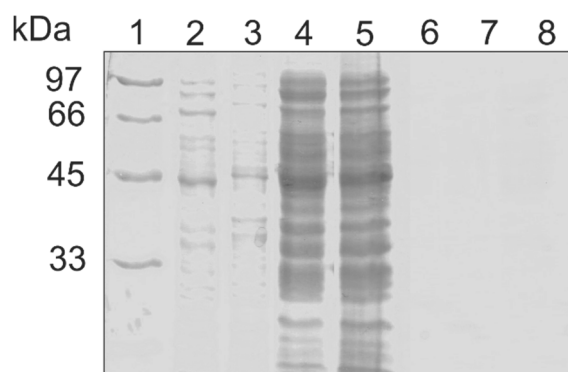


Abb. 4-41: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von His₈-EAW25547 (pKM25) in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 6 h Induktion, Spur 4: löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1, Spur 8: Elutionsfraktion 2.

Vergleicht man die Laufspuren 2 und 3 miteinander konnte keine Proteinbande für His₈-EAW25547 oberhalb der 45 kDa-Bande des Proteingrößenstandards beobachtet werden. In Tab. 4-12 sind die untersuchten Expressionsbedingungen für His₈-EAW25547 in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen zusammengefasst. Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte ähnliche Ergebnisse wie in Abb. 4-41 dargestellt.

Tab. 4-12: Getestete Expressionsbedingungen von His₈-EAW25547 (pKM25) in *E. coli* BL21 (DE3).

<i>E. coli</i> Stamm	Medium	Induktion	Temperatur [°C]	Inkubationsdauer [h]
BL21 (DE3)	100 ml LB	0,1 mM IPTG	30	6
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	30	6
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	37	6
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	37	6
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	20	6
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	20	6
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	30	16
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	30	16
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	37	16
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	37	16
	100 ml LB	0,1 mM IPTG	20	16
	100 ml LB	0,5 mM IPTG	20	16

4.3 Untersuchungen zu nichtribosomalen Peptidsynthetasen aus Ascomyceten

4.3.1 Einleitung

Die Beteiligung der NRPS Pc21g15480 an der Biosynthese von Roquefortin C und Meleagrinen in *P. chrysogenum*, konnte bereits durch vorherige „knock out“-Experimente nachgewiesen werden (Ali *et al.*, 2013; Garcia-Estrada *et al.*, 2011). Dabei katalysiert die NRPS den ersten Schritt des Biosyntheseweges, die Verknüpfung von L-Tryptophan und L-Histidin zu cyclo-L-Trp-L-His. Das Gen *Pc21g15480* aus *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 befindet sich in einem Gencluster welches sowohl für die Biosynthese als auch die Sekretion der Mykotoxine verantwortlich ist (Garcia-Estrada *et al.*, 2011). Es wird postuliert, dass das putative Gencluster insgesamt aus 8 Genen (*Pc21g15420* - *Pc21g15490*) besteht und eine Gesamtgröße von 24,3 kb aufweist. Ein Vergleich der Sequenzen zeigte, dass 3 der 8 Gene Identitäten von maximal 68 % auf Aminosäureebene zu dem CdpC3PT-Gencluster aus *N. fischeri* NRRL181 aufweisen (Abb. 4-42).

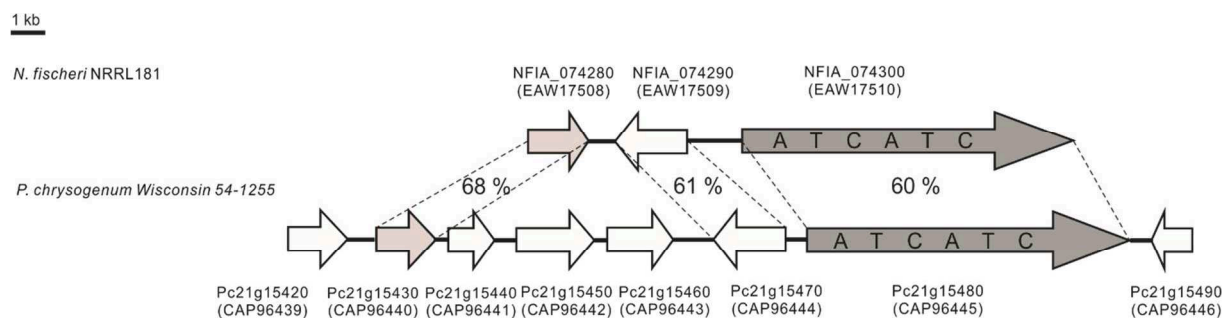


Abb. 4-42: putatives Roquefortin C und Meleagrinen Gencluster von *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 und die homologen Gene von *N. fischeri* NRRL181.

Die NRPS CAP96445 aus *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 weist dabei eine 60 %ige Sequenzidentität zu der NRPS EAW17510 aus *N. fischeri* NRRL181 auf. CAP96445 und EAW17510 sind jeweils aus 2 Modulen mit einer Domänen-Struktur von ATCATC aufgebaut. Jedes Modul ist durch das Vorhandensein einer Adenylierungs- (A), Thioester- (T) und Kondensations- (C) Domäne charakterisiert. Diese Tatsache und die Ergebnisse der Prenyltransferase CdpC3PT, deuten darauf hin, dass auch die NRPS EAW17510 in der Lage ist zyklische Dipeptide zu synthetisieren. Um dies zu prüfen, sollte zum Einem die Funktion der NRPS *Pc21g15480* *in vivo* bestätigt und zum Anderem die NRPS *NFIA_074300* durch die heterologe Expression in *A. nidulans* TN02A7 untersucht werden.

Die NCBI-Annotierung des Gens *Pc21g15480* wies eine Intron-Exon-Struktur bestehend aus 4 Exons (Exongrößen: 375/6555/153/36 bp) und 3 Introns (Introngrößen: 53/56/230 bp) auf (Sequenz in GenBank unter Accession Nr.: NW_003020110). Im Vergleich dazu ist die NRPS *NFIA_074300* aus 2 Exons (6399/141 bp) und 1 Intron (103 bp) aufgebaut (Sequenz in GenBank unter Accession Nr.: NW_001509762).

4.3.2 Charakterisierung der NRPS *Pc21g15480* aus *P. chrysogenum*

4.3.2.1 Amplifikation des NRPS-Gens *Pc21g15480* und des *gpdA*-Promotorbereiches

Pc21g15480 (22862,613 bp -22869,753 bp, Sequenz in Genbank mit Accession Nr.: NS_000201) wurde mittels Expand Long Template PCR System von der gDNA aus *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 amplifiziert. Die Abb. 4-43 zeigt die Kontrolle der PCR durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Das Gen konnte mit einer Größe von 7140 bp durch die Primer KM_Pc15480-3 und KM_Pc15480-4 und unter Verwendung des angegebenen Temperaturschemas (Abb. 4-43) erfolgreich amplifiziert werden.

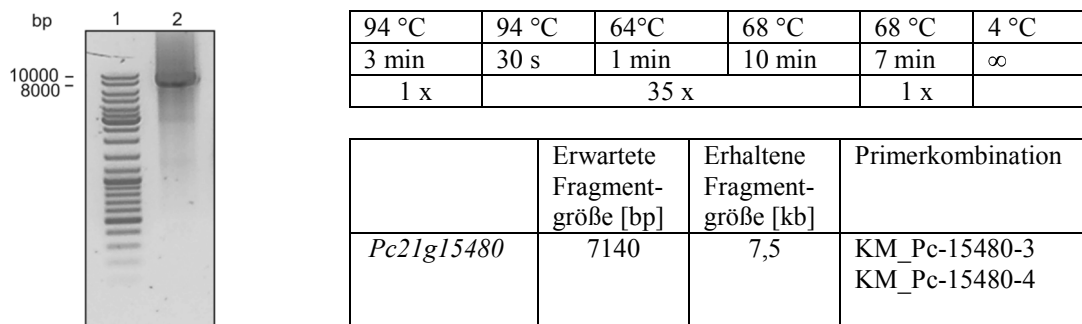


Abb. 4-43: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *Pc21g15480* aus gDNA. Laufspur 1: DNA-Größenstandard; Laufspur 2: PCR-Produkt von *Pc21g15480* aus gDNA.

Für eine stärkere Expression des NRPS-Gens *Pc21g15480* in dem Pilzstamm *A. nidulans* TN02A7 wurde der konstitutive Promotor *gpdA* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) von der gDNA aus dem sequenzierten Pilzstamm *A. nidulans* A4 amplifiziert. Mit Hilfe des Expand High Fidelity^{Plus} PCR System Plus und den Primern KM_*gpdA*-1 und KM_*gpdA*-2 wurde das PCR-Fragment mit einer Größe von 1463 bp amplifiziert. Die Primer KM_*gpdA*-1 und KM_*gpdA*-2 brachten dabei die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xba*I ein. Die Kontrolle der PCR ist in Abb. 4-44 dargestellt.

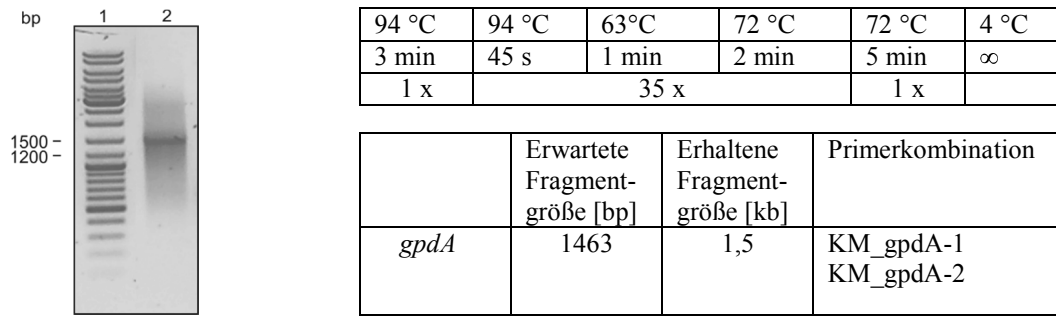


Abb. 4-44: Agarosegel der PCR-Amplifikation des *gpdA*-Promotors aus gDNA. DNA-Größenstandard; Laufspur 2: PCR-Produkt von *gpdA* aus gDNA.

4.3.2.2 Klonierung und Transformation

Die erfolgreich amplifizierten PCR-Fragmente der NRPS *Pc21g15480* und des Promotors *gpdA*, wurden daraufhin in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert. Nach der Hitzeschock-Transformation in *CaCl*₂-kompetente *E. coli* DH5α Zellen und der anschließenden Blau-Weiß-Selektion, erfolgte die Kontrolle der Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (Abb. 4-45, Abb. 4-46).

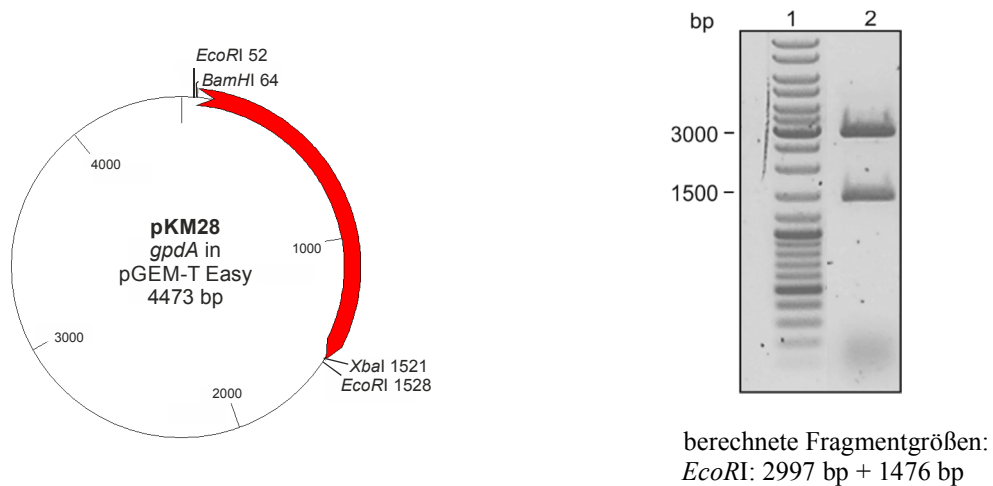


Abb. 4-45: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM28 (*gpdA* in pGEM-T Easy) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Nach Bestätigung der enthaltenen Sequenzen durch Sequenzierung wurden die erhaltenen Konstrukte mit pKM28 (pGEM-T Easy + *gpdA*) und pKM30 (pGEM-T easy + *Pc21g15480*) bezeichnet.

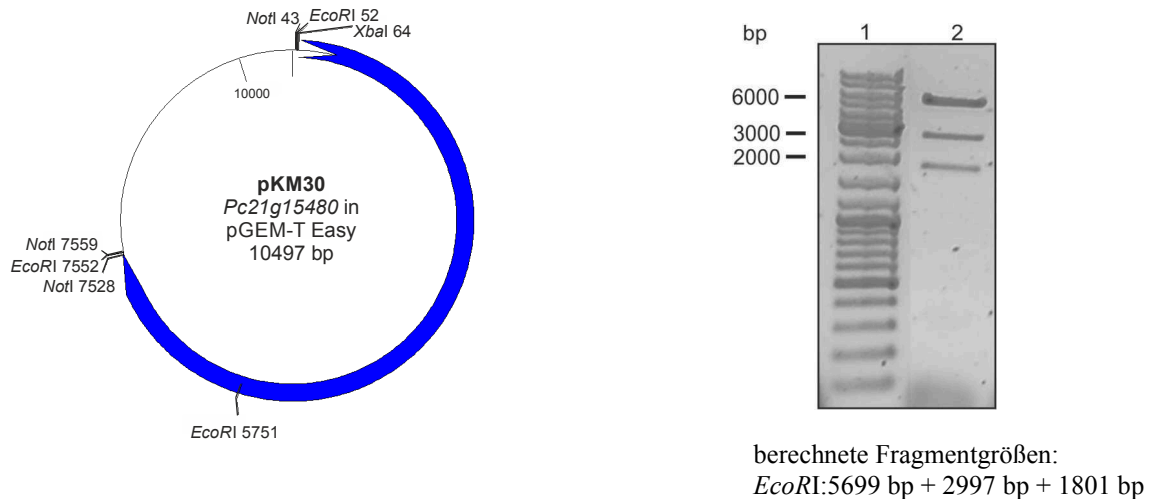


Abb. 4-46: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM30 (*Pc21g15480* in pGEM-T Easy) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Das Konstrukt pKM28 wurde durch die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xba*I verdaut und das 1457 bp große Fragment über Gelextraktion isoliert. Das *Bam*HI/*Xba*I-Fragment wurde in den Expressionsvektor pJW24, der zuvor ebenfalls mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt worden ist, eingebracht. Die erhaltenen Klone wurden mit Hilfe eines *Bam*HI/*Xba*I Doppelverdaus auf das Vorhandensein des *gpdA*-Promotors überprüft (Abb. 4-47). Das positive Konstrukt wurde als pKM31 bezeichnet und anschließend für die weitere Klonierung durch das Restriktionsenzym *Not*I/*Xba*I linearisiert und durch die SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoriert.

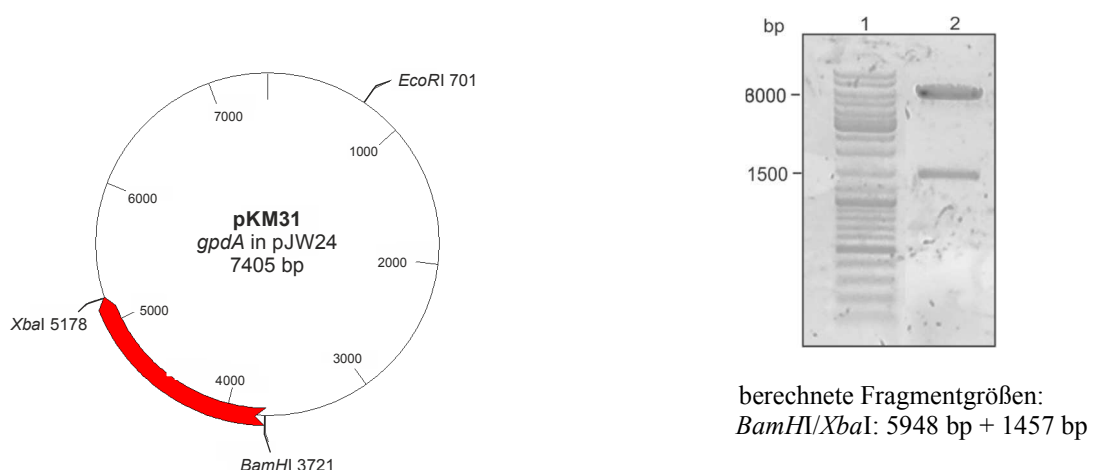


Abb. 4-47: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM31 (*gpdA* in pJW24) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Zur Fertigstellung des Expressionskonstruktes wurde das pKM30-Konstrukt ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *Not*I/*Xba*I geschnitten und das 7460 bp große Fragment direkt hinter den

gpdA-Promotor in das pKM31-Konstrukt eingebracht. Die Überprüfung der erhaltenen Klone erfolgte mittels *Pvu*II-Verdaus (Abb. 4-48). Das resultierende Konstrukt wurde als pKM36 bezeichnet.

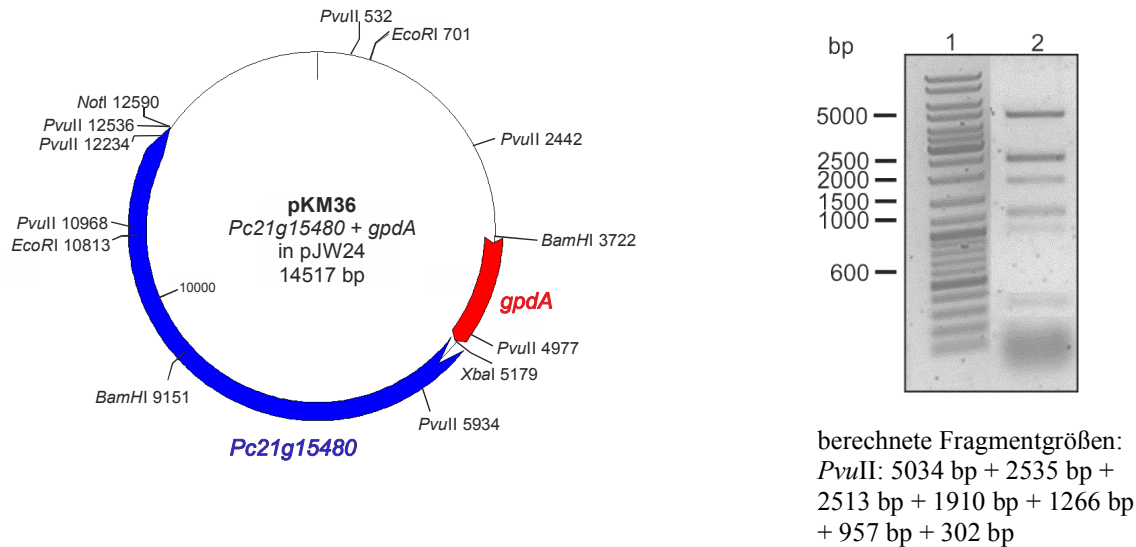


Abb. 4-48: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM36 (*Pc21g15480* mit *gpdA* in pJW24) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.3.2.3 Transformation in *A. nidulans* TN02A7

Das vollständige Expressionskonstrukt pKM36 wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *Not*I linearisiert und durch Protoplastierung (Kapitel 3: Punkt 3.6.12) in den Pilzstamm *A. nidulans* TN02A7 transformiert. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der untransformierten Protoplasten auf Medium ohne Uracil und Uridin unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Platten wurden bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Der Titer der Protoplasten wurde als $0,6 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bestimmt. Nach 3 Tagen Inkubationszeit konnten 3 Transformanten auf AMM-Platten vereinzelt werden.

4.3.2.4 Kultivierung und Analyse der Transformanten

Nach der gDNA-Extraktion der Transformanten (Kapitel 3: Punkt 3.6.1.2) wurde die Integration der NRPS *Pc21g15480* in das Genom von *A. nidulans* TN02A7 überprüft. Hierbei konnte durch Amplifikation eines 2500 bp großen Genbereichs (Sequenz in GenBank unter Accession Nr. NW_003020110.1: 3651,283 bp bis 3653,783 bp), die NRPS *Pc21g15480* in den Transformanten nachgewiesen werden (Abb. 4-49: Laufspuren 2, 3 und 4). Als

Negativkontrolle diente die gDNA von *A. nidulans* TN02A7 (Abb. 4-49: Laufspur 6) und als Positivkontrolle die gDNA von *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (Abb. 4-49: Laufspur 5).

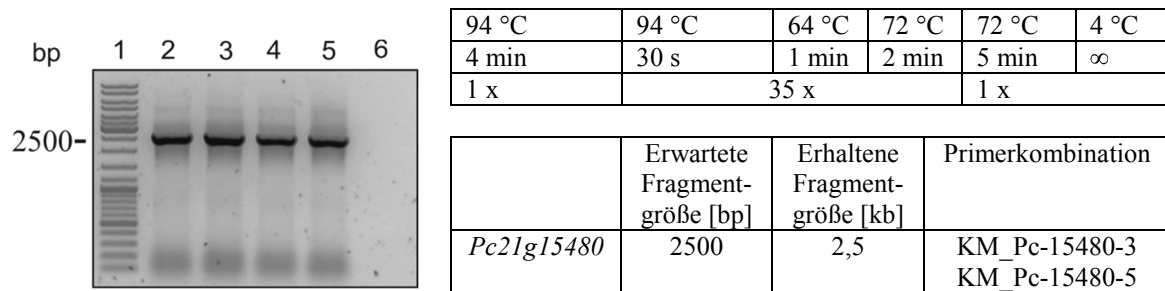


Abb. 4-49: Agarosegel der PCR-Amplifikation eines 2500 bp großen Genfragmentes von *Pc21g15480* aus gDNA zur Überprüfung der Transformanten. Laufspur 1: DNA-Größenstandard; Laufspur 2: PCR-Produkte der Transformanten *A. nidulans* KM01-KM03 (*Pc21g15480*); Laufspur 4: PCR-Produkt der Positivkontrolle *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255; Laufspur 6: Negativkontrolle *A. nidulans* TN02A7.

Die Transformanten wurden im Anschluss daran in 100 ml AMM-Medium bei 37 °C und 130 rpm für 5 Tage unter Lichtausschluss kultiviert. Nach dem Ausschütteln mit 1: 1 Volumen an Ethylacetat wurde die organische Phase aufgefangen und bis zur Trockene eingedunstet. Die Kulturextrakte wurden in 1000 µl Methanol aufgenommen und filtriert. Die Analyse erfolgte mittels HPLC (Abb. 4-50). Der Pilzstamm *A. nidulans* TN02A7 (Abb. 4-50: D) wurde als Negativkontrolle und cyclo-L-Trp-L-His (Abb. 4-50: E) als Standard mitgeführt.

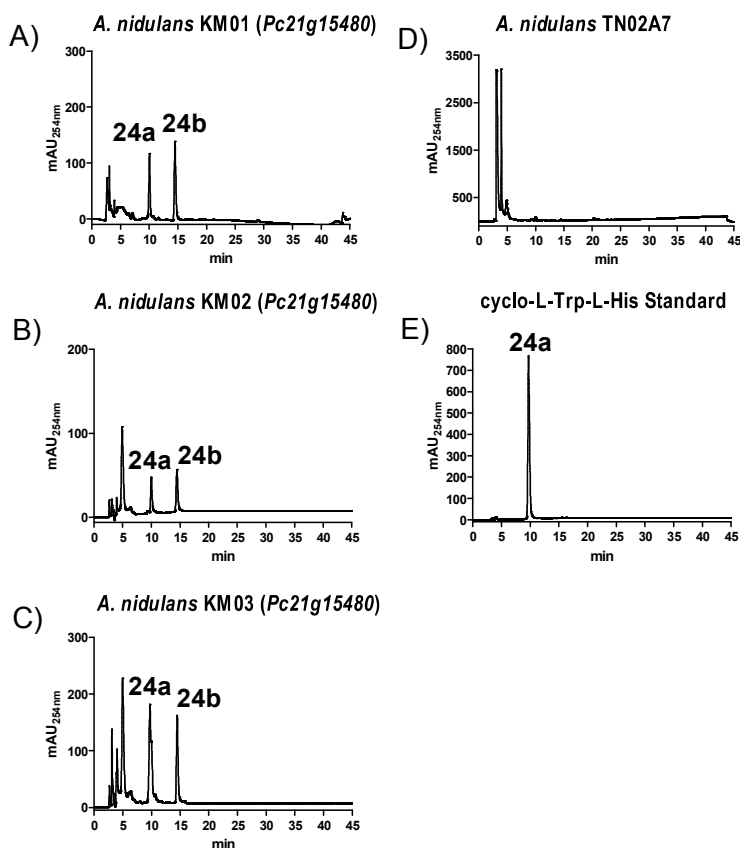


Abb. 4-50: HPLC-Chromatogramme von A)-C) Transformanten *A. nidulans* KM01-KM03 (*Pc21g15480*), D) *A. nidulans* TN02A7; E) cyclo-L-Trp-L-His Standard. Der Substanz cyclo-L-Trp-L-His ist mit a und die Produkte mit b bezeichnet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 130 rpm für 5 Tage.

Wie in Abb. 4-50 zu erkennen, konnten in allen 3 Transformanten 2 zusätzliche Peaks (**24a**, **24b**) mit einer Retentionszeit von jeweils 9,9 min und 14,4 min (Abb. 4-50: A, B und C) im Vergleich zum *A. nidulans* TN02A7 Wildtyp (Abb. 4-50: D) detektiert werden. Der erste Peak **24a** zeigte zudem mit einer Retentionszeit von 9,9 min, die gleiche Retentionszeit wie der Standard cyclo-L-Trp-L-His (Abb. 4-50: E) auf. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem 1. Peak **24a** um die Substanz cyclo-L-Trp-L-His und bei **24b** um ein weiter metabolisiertes Derivat von **24a** handelt.

4.3.2.5 Strukturaufklärung der isolierten Produkte

Die Isolierung der neu entstandenen Sekundärmetabolite (**24a**, **24b**) erfolgte aus insgesamt 3 Litern Kultur, welche in 3 x 1000 ml Erlmeyerkolben für 5 Tage bei 130 rpm und 37 °C in Dunkelheit inkubiert wurden. Aus einem Liter Kultur konnten insgesamt 6 mg **24 a** und 4 mg **24 b** gewonnen werden. Die Isolierung beider Produkte erfolgte mittels HPLC. Die Strukturen

der Produkte wurden mit spektroskopischen Methoden (HR-ESI-MS sowie $^1\text{H-NMR}$) untersucht. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Produkt **24a** befindet sich im Anhang (Abb.7-24). Der Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des isolierten Produktes (**24a**) mit den Daten von cyclo-L-Trp-L-His (Yu und Li, unveröffentlichte Daten) zeigt, dass die erhaltenen Signale miteinander übereinstimmen. Auch das Elektrospray-Ionisations-Spektrum (ESI) der Probe bestätigte dieses Ergebnis und es konnte eine molekulare Masse von 347 g/mol nachgewiesen werden (Abb.7-23). Dabei konnte der Produktpeak **24a** eindeutig als cyclo-L-Trp-L-His identifiziert werden (Tab. 4-13). Die Struktur des Produktes **24b** konnte hingegen im Rahmen dieser Arbeit noch nicht eindeutig geklärt werden.

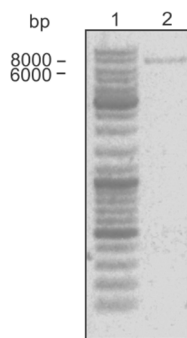
Tab. 4-13: $^1\text{H-NMR}$ -Daten des isolierten Produktes 24a von *Pc21g15480* im Vergleich mit cyclo-L-Trp-L-His.

Position	cyclo-L-Trp-L-His in DMSO- d_6 (Yu und Li, unveröffentlichte Daten)	24a in DMSO- d_6 mit D $_2$ O
	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])
NH-1	11,11 s	-
H-2	7,07 br.s	7,07 br s
H-4	7,58 d (8,0)	7,56 d (7,9)
H-5	7,08 td (7,5; 1,1)	7,09 t (7,5)
H-6	6,98 td (7,5; 1,0)	6,99 t (7,5)
H-7	7,36 d (8,1)	7,34 d (8,1)
H-10a	3,13 dd (14,6; 4,3)	3,09 dd (14,5; 4,3)
H-10b	3,01 dd (14,5; 4,6)	2,97 dd (14,5; 4,5)
H-11	4,12 m	4,10 t (4,3)
NH-12	8,16 d (2,3)	-
H-14	3,82 m	3,76 d (9,4; 4,1)
NH-15	7,71 d (2,5)	-
H-17	2,39 dd (14,5; 3,9) 1,27 dd (14,5; 9,4)	2,35 dd (14,3; 4,0) 1,23 dd (14,3; 9,3)
H-20	8,02 s	7,86 s
H-22	6,06 s	5,98 s

4.3.3 Untersuchungen zu der NRPS *NFIA_074300* aus *N. fischeri*

4.3.3.1 Amplifikation von *NFIA_074300* aus gDNA von *N. fischeri* NRRL181

NFIA_074300 (Sequenz in GenBank unter Accession Nr. NW_001509762: 573,200 bp bis 581,816 bp) wurde mittels des Mid-Range PCR Systems von der Firma Peqlab und der Primer KM_074300-1 und KM_074300-2 mit einer Größe von 8643 bp (Gengröße: 6643 bp mit 1354 bp eigenem Promotor und 620 bp eigenem Terminator) aus der gDNA von *N. fischeri* NRRL181 amplifiziert (Abb. 4-51).



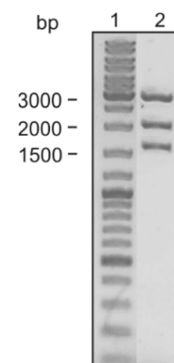
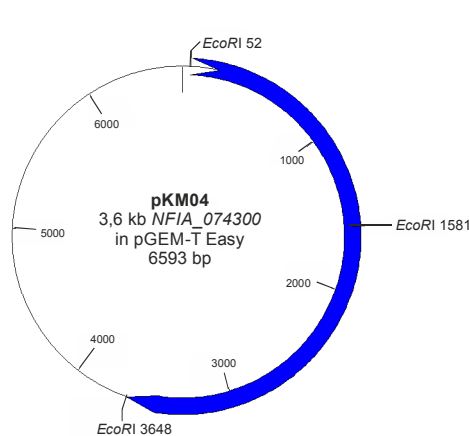
94 °C	94 °C	61 °C	72 °C	72 °C	4 °C
3 min	45 s	1 min	2 min	5 min	∞
1 x	35 x			1 x	

	Erwartete Fragment- größe [bp]	Erhaltene Fragment- größe [kb]	Primerkombination
<i>NFIA_074300</i>	8643	8,8	KM_074300-1 KM_074300-2

Abb. 4-51: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *NFIA_074300* aus gDNA. Laufspur 1: DNA-Größenstandard; Laufspur 2: PCR-Produkt von *NFIA_074300* aus gDNA.

4.3.3.2 Klonierung und Transformation in *E. coli*

Daraufhin wurde versucht das PCR-Fragment in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy zu ligieren. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone wurde mittels *EcoRI* kontrolliert (Abb. 4-52). Dabei konnte ein Klon mit einem kleineren Insert festgestellt werden (pKM04).



berechnete Fragmentgrößen:
EcoRI: 2997 bp + 2067 bp + 1529 bp

Abb. 4-52: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM04 (3,6 kb *NFIA_074300* in pGEM-T Easy) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Durch Sequenzierung des pGEM-T Easy-Konstruktes pKM04, konnte eine verkürzte Teilsequenz mit einer Größe von ca. 3,6 kb im 3'-Bereich von *NFIA_074300* nachgewiesen werden. Um die fehlende 5'-Gensequenz zu erhalten, wurde auf ein pGEM-T Easy Konstrukt von Herrn Dr. Wen-Bing Yin (pWY26) zurückgegriffen, welches bereits 5055 bp von *NFIA_074300* enthielt und eine Gesamtgröße von 8072 bp aufzeigte. Das Konstrukt pKM04 wurde mit einem *Bam*HI/*Spe*I-Doppelverdau geschnitten und das 3550 bp große Fragment mittels Gelaufreinigung isoliert. Die aufgereinigte Bande wurde mit dem 6723 bp großen *Bam*HI/*Spe*I-Fragment des pWY26-Konstruktes zusammen ligiert. Nach dem Erhalt der Klone wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt und mittels *Eco*RI-Verdau verifiziert (Abb. 4-53).

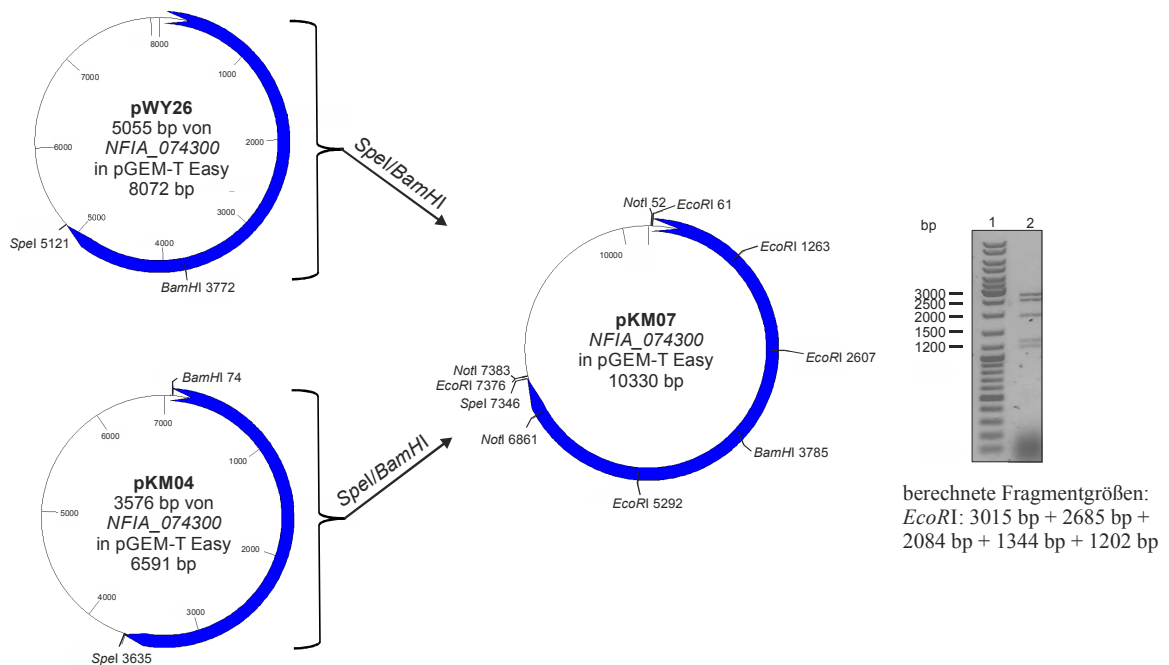


Abb. 4-53: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM07 (*NFIA_074300* in pGEM-T Easy) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Wie in Abb. 4-53 zu erkennen ist, konnte ein Klonierungskonstrukt (pKM07) mit der Gesamtgröße von 10330 bp hergestellt werden, welches das komplette Gen *NFIA_074300* (6643 bp) mit eigenem Terminatorbereich (703 bp) enthält. Das Konstrukt pKM07 wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *Not*I verdaut und das 6809 bp große Fragment durch Gelextraktion gewonnen. Nachstehend wurde eine Ligation mit dem bereits *Not*I-linearisierten Expressionsvektor pJW24 und eine Transformation in CaCl_2 -kompetente *E. coli* DH5 α Zellen

durchgeführt. Die erhaltenen Klone wurden durch einen *NotI*-Verdau überprüft (Abb. 4-54). Das resultierende Expressionskonstrukt wurde als pKM10 bezeichnet.

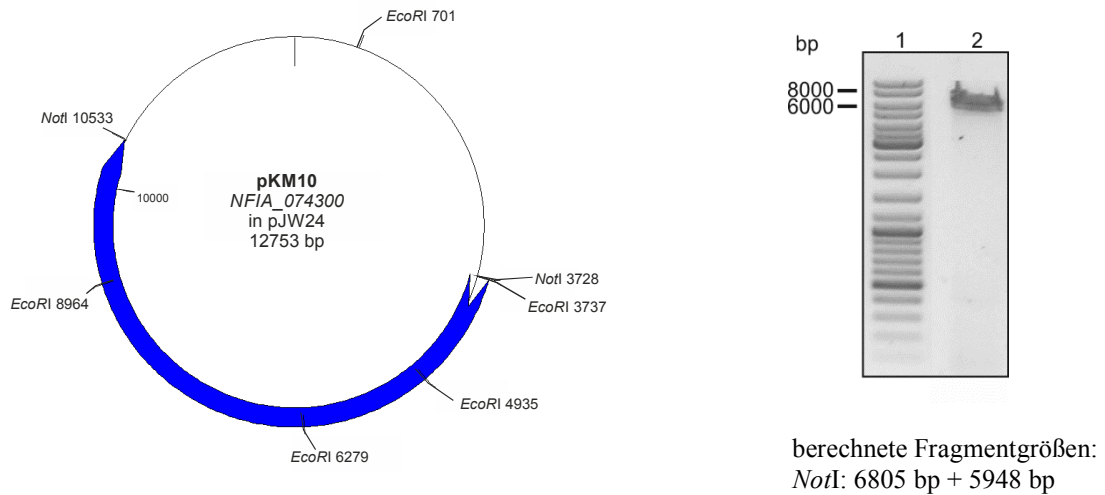


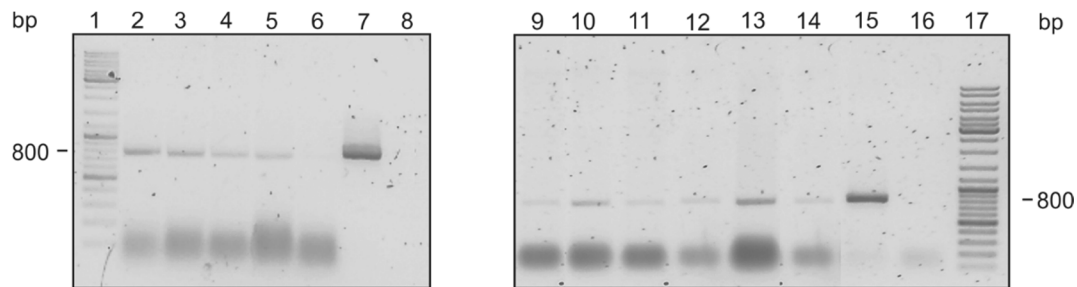
Abb. 4-54: 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM10 (*NFIA_074300* in pJW24) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

4.3.3.3 Transformation in *A. nidulans* TN02A7

Das resultierende Expressionskonstrukt pKM10 wurde daraufhin durch Protoplastierung (Kapitel 3.6.12) in den Pilzstamm *A. nidulans* TN02A7 transformiert. Als Negativkontrolle wurde erneut ein Teil der untransformierten Protoplasten auf Medium ohne Uracil und Uridin unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Platten wurden bei 37 °C unter Lichtausschluß inkubiert. Der Titer der Protoplasten wurde als $1,78 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bestimmt. Nach 3 Tagen Inkubationszeit konnten 11 Transformanten auf AMM-Platten vereinzelt werden.

4.3.3.4 Kultivierung und Analyse der Transformanten

Die Integration des NRPS-Gens *NFIA_074300* in das Genom von *A. nidulans* TN02A7 wurde durch die Amplifikation eines 800 bp großen Genfragmentes von *NFIA_074300* (Sequenz in GenBank unter Accession Nr. NW_001509762: 578,181 bp bis 578,980 bp) von gDNA der Transformanten kontrolliert. Dabei wurde die Taq-Polymerase und die Primer KM_074300-3 und KM_074300-4 verwendet. Durch die Amplifikation konnte in 10 von 11 Transformanten der 800 bp große Genbereich von *NFIA_074300* nachgewiesen werden (Abb. 4-55: Laufspuren 2-5, 9-14). Der Transformant KM08 (Abb. 4-55: Laufspur 6) wies hingegen als Einziger keine PCR-Bande auf und wurde deshalb nicht für weitere Kultivierungsanalysen ausgewählt. Als Negativkontrolle diente die gDNA von *A. nidulans* TN02A7 (Abb. 4-55: Laufspuren 8, 16) und als Positivkontrolle die gDNA von *N. fischeri* NRRL181 (Abb. 4-55: Laufspuren 7, 15).



94 °C	94 °C	68 °C	68 °C	68 °C	4 °C
5 min	30 s	1 min	2 min	15 min	∞
1 x		30 x			1 x

	Erwartete Fragment- größe [bp]	Erhaltene Fragment- größe [bp]	Primerkombination
<i>NFIA_074300</i>	800	800	KM_074300-3 KM_074300-4

Abb. 4-55: Agarosegele der PCR-Amplifikation eines 800 bp großen Genfragmentes von *NFIA_074300* aus gDNA zur Überprüfung der Transformanten. Laufspur 1,17: DNA-Größenstandard; Laufspur 2-6: PCR-Produkte der Transformanten *A. nidulans* KM04-KM08 (*NFIA_074300*); Laufspur 9-14: PCR-Produkte der Transformanten *A. nidulans* KM09-KM14; Laufspur 7,15: PCR-Produkte der Positivkontrolle *N. fischeri* NRRL181; Laufspur 8,16: Negativkontrolle *A. nidulans* TN02A7.

Die Kultivierung der Transformanten erfolgte in 100 ml AMM-Medium bei 37 °C und 130 rpm für 5 Tage in Dunkelheit. Nach der Behandlung der Proben (Kapitel 3.8.1) erfolgte die Analyse mittels HPLC (Abb. 4-56: A-K). Dabei wurde der Pilzstamm *A. nidulans* TN02A7 (Abb. 4-56: K) als Negativkontrolle und cyclo-L-Trp-L-His (Abb. 4-56: L) als Standard mitgeführt (Abb. 4-56).

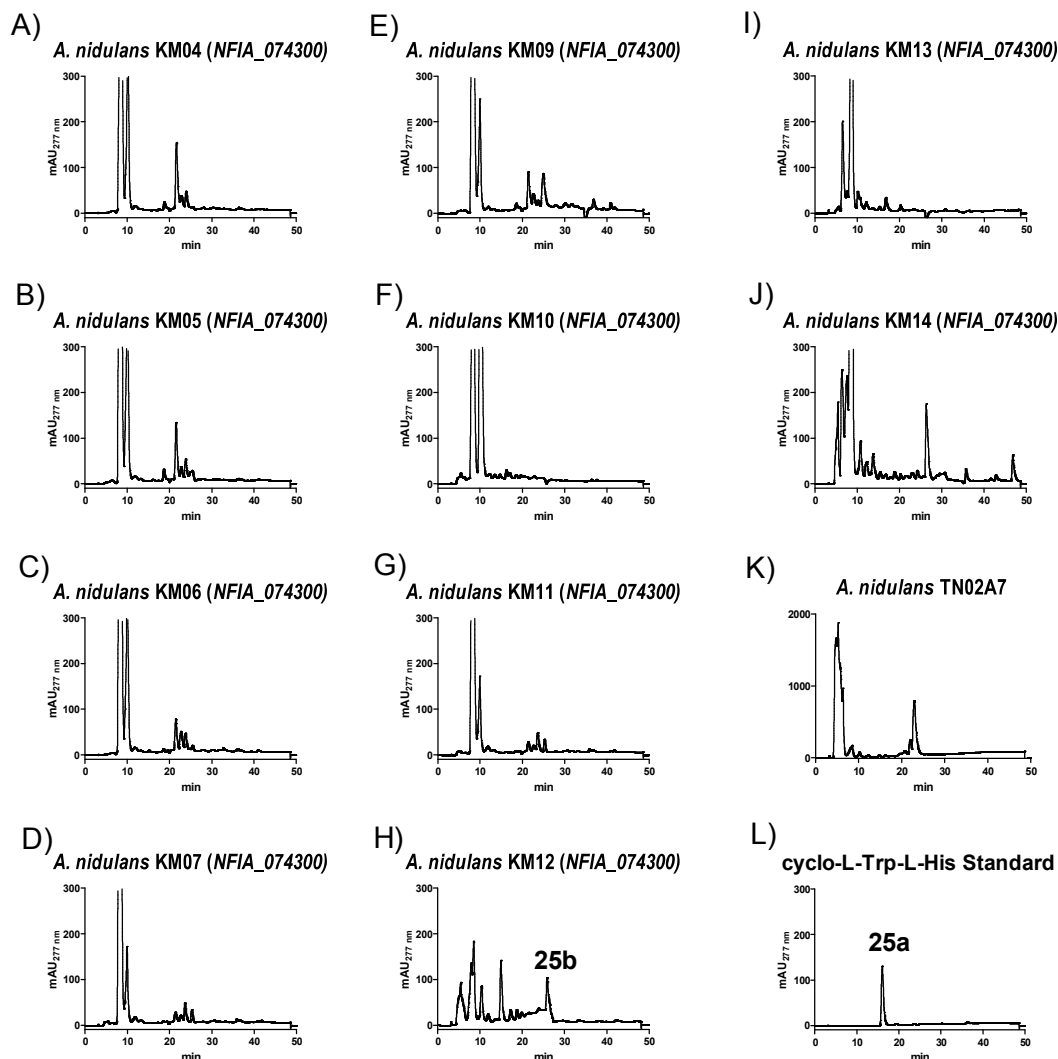


Abb. 4-56: HPLC-Chromatogramme für A)-J) Transformanten *A. nidulans* KM04-KM14 (NFIA_074300), K) *A. nidulans* TN02A7; L) cyclo-L-Trp-L-His Standard. Die Kultivierung erfolgte in 100 ml AMM-Medium bei 37 °C und 130 rpm für 5 Tage.

Wie in Abb. 4-56 zu beobachten ist, zeigten die Transformanten 4-7 (Abb. 4-56: A-D) sowie 9-11 und 13-14 (Abb. 4-56: E-G, I-J) keine neue Produktbildung im Vergleich zum Pilzstamm *A. nidulans* TN02A7 (Abb. 4-56: K) auf. Bei dem Transformanten *A. nidulans* KM12 (NFIA_074300) (Abb. 4-56: H) hingegen konnte ein zusätzlicher Peak mit einer Retentionszeit von 24,8 min festgestellt werden.

4.3.3.5 Strukturaufklärung der isolierten Produkte

Zur Strukturaufklärung des neu entstandenen Peaks (**25b**) mit einer Retentionszeit von 24,8 min, wurden insgesamt 2,5 Liter Kultur von dem Transformanten *A. nidulans* NFIA_074300 KM12 (Abb. 4-56: I) angesetzt und für 5 Tage bei 37 °C und 130 rpm inkubiert.

Nach entsprechender Bearbeitung der Proben (Kapitel 3.8.1) erfolgte die Isolierung mittels HPLC. Aus einem Liter Kultur konnten insgesamt 4 mg **25b** gewonnen werden. Die Struktur des Produktes wurde mittels ESI-MS und ^1H -NMR aufgeklärt. Das ^1H -NMR-Spektrum des Produktes befindet sich im Anhang (Abb.7-26). Mit Hilfe der ^1H -NMR Analyse konnten die Struktur des Produktes aufgeklärt werden (Tab.4-14). Der Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums mit der Literatur (Wiemann *et al.*, 2013), führte zur eindeutigen Identifizierung des Produktes als Pseurotin A. Dabei stimmten die gemessenen ^1H -NMR-Daten des isolierten Produktes gut mit den zuvor publizierten Daten überein. Auch das Elektrospray-Ionisations-Spektrum (ESI) der Probe bestätigte dieses Ergebnis und es konnte eine molekulare Masse von 431 g/mol nachgewiesen werden (Abb.7-25).

Tab.4-14: ^1H -NMR-Daten des isolierten Produktes von *NFLA_074300* im Vergleich zur Literatur.

Position	Pseurotin A (Wiemann <i>et al.</i> , 2013) in CD_3OD	25b in CD_3OD
	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_{H} [ppm] Multiplizität (J [Hz])
NH-7	9,20 brs	-
8-OCH ₃	3,40 s	3,36 s
H-9	4,67 s	4,55 s
H-10	4,69 d (8,0)	4,52 d (6,6)
H-11	4,58 d (8,0)	4,68 ddd (8,9; 6,8; 0,9)
H-12	5,49 m	5,48 ddt (10,8; 9,0; 1,4)
H-13	5,51 m	5,63 dt (11,0; 7,4)
H-14	2,08 m	2,10 – 2,24 m
H-15	0,92 t (7,6)	0,99 t (7,5)
H-16	1,72 s	1,78 s
H-19	8,27 dd (8,8; 1,2) ^a	8,36 d (7,4) ^c
H-20	7,53 t (8,0) ^b	7,52 t (7,5) ^d
H-21	7,68 t (8,0)	7,66 tt (7,4; 1,1)
H-22	7,53 t (8,0) ^b	7,52 t (7,5) ^c
H-23	8,27 dd (8,8; 1,2) ^a	8,36 d (7,4) ^d

^{a-d}: Signale mit gleichen Buchstaben sind überlappend

4.3.3.6 Analyse des Pilzstammes *A. nidulans* TN02A7

Literaturrecherchen ergaben, dass Pseurotin A bisher nur als Endprodukt des entsprechenden Genclusters in *A. fumigatus* Af293 bekannt ist (Maiya *et al.*, 2007). Analysen der Gensequenzen zeigten jedoch ebenfalls ein orthologes Gencluster in dem Pilzstamm *A. clavatus* NRRL1 mit Identitäten von 86 % – 93 % auf Aminosäureebene auf (Abb. 4-57).

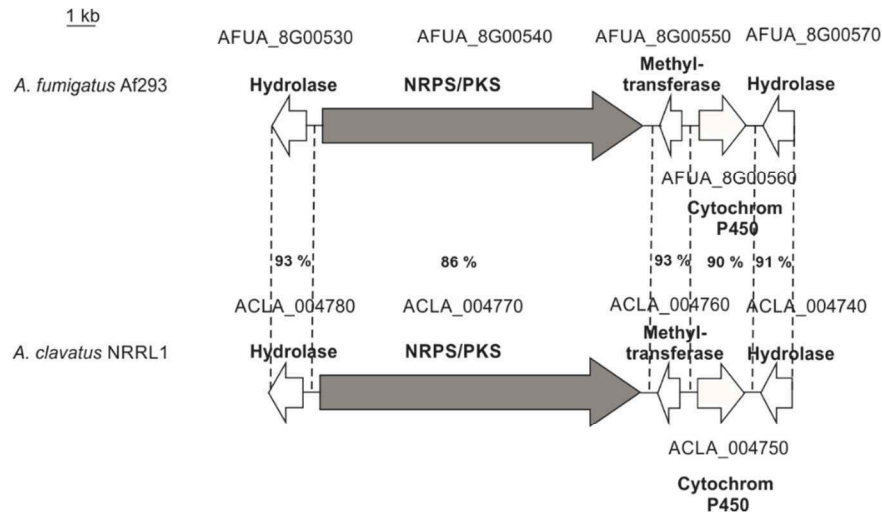


Abb. 4-57: putatives Gencluster von Pseurotin A in *A. fumigatus* Af293 und *A. clavatus* NRRL1. Das NRPS/PKS-Genhybrid wurde Schwarz markiert.

Daraufhin wurden verschiedene PCR-Experimente durchgeführt um zum Einem eine mögliche Kontamination des Pilzstammes auszuschließen und zum Anderem um die Identität von *A. nidulans* TN02A7 zu überprüfen. Nachstehend sind zwei PCR-Versuche als Beispiel dargestellt. Zum Nachweis das der Pilzstamm nicht kontaminiert ist wurde die gDNA von *A. nidulans* TN02A7 unter anderem mit Hilfe der Primer KM_042210-1 und KM_042210-2 (für die Prenyltransferase *ACLA_042210* aus *A. clavatus* NRRL1) untersucht (Abb. 4-58). Als Negativkontrollen wurden mitgeführt. Dabei zeigte jedoch nur die Positivkontrolle (*A. clavatus* NRRL1, Abb. 4-58: Laufspur 2) ein Amplifikationsprodukt mit einer Größe von 1400 bp (theoretische Größe 1357 bp) auf.

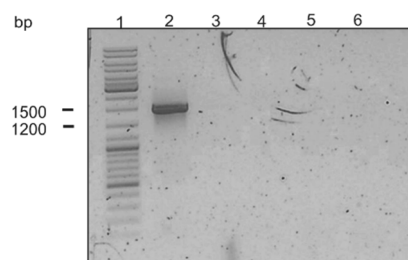


Abb. 4-58: Agarosegele der PCR-Amplifikation von *ACLA_042210* aus gDNA zur Überprüfung des Pilzstammes *A. nidulans* TN02A7. Laufspur 1: DNA-Größenstandard, 2: gDNA *A. clavatus* NRRL1, 3: gDNA Transformant 9, 4: gDNA *A. nidulans* TN02A7, 5: gDNA *A. nidulans* FGSC A4, 6: gDNA *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255.

Um herauszufinden, inwieweit in dem nicht sequenzierten Pilz *A. nidulans* TN02A7 das Pseurotin A Gencluster vorhanden ist, wurden anhand der Gensequenz von *Afu8500540* aus dem Pilzstamm *A. fumigatus* Af293 und *ACLA_004770* aus dem Pilzstamm *A. clavatus* NRRL1 (NRPS/PKS des Pseurotin A Clusters, Abb. 4-57) Primer synthetisiert. Die Primer KM_Afu8G00540-1 und KM_Afu8G00540-2 wurden dabei so synthetisiert, dass sie in einem übereinstimmendem Bereich beider Gensequenzen binden und ein PCR-Produkt von 2000 bp mit der Taq-Polymerase amplifiziert werden konnte. Die Überprüfung erfolgte durch eine Gradienten-PCR um mögliche Unterschiede in der Annealingtemperatur auszuschließen. Dabei diente die gDNA von *A. clavatus* NRRL1 als Positivkontrolle (Abb. 4-59: Laufspur 1) und die gDNA von *A. nidulans* FGSC A4 als Negativkontrolle (Abb. 4-59: Laufspur 2).

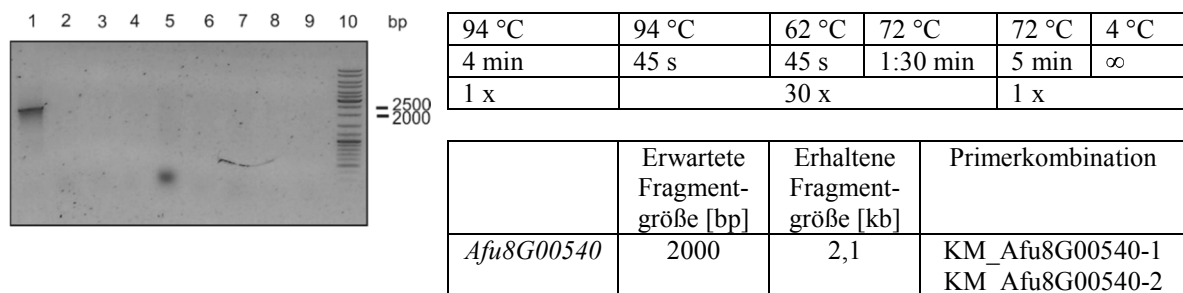


Abb. 4-59: Agarosegele der Gradienten-PCR eines 2000 bp großen Genfragmentes von *Afu8G00540* zur Überprüfung des Pilzstammes *A. nidulans* TN02A7. Laufspur 1: gDNA *A. clavatus* NRRL1; 2: gDNA *A. nidulans* FGSC A4; 3-9: gDNA *NFIA_074300*-Transformant KM12 mit Annealingtemperaturen von 63,6 °C, 62,8 °C, 61,8 °C, 60,2 °C, 59,1 °C, 58,4 °C, 58 °C; 10: DNA-Größenstandard.

Durch die Verwendung der Primer KM_Afu8G00540-1 und KM_Afu8G00540-2 konnte das Vorhandensein eines putativen NRPS/PKS-Genhybrides in *A. nidulans* TN02A7 nicht bestätigt werden (Abb. 4-59; Laufspuren: 3 bis 9). Lediglich die Positivkontrolle *A. clavatus* NRRL1 (Abb. 4-59: Laufspur 1) wies ein PCR-Produkt mit einer Größe von 2000 bp auf.

Schlussfolgernd dazu, konnte weder eine mögliche Kontamination, noch das Vorhandensein eines NRPS/PKS-Genhybrides codierend für Pseurotin A in dem Pilzstammes *A. nidulans* TN02A7 nachgewiesen werden.

4.3.4 Untersuchungen zur Koexpression von Prenyltransferasen und NRPS in *A. nidulans* TN02A7

4.3.4.1 Einleitung

Durch biochemische Untersuchungen der rekombinanten Proteine konnte in den vergangenen Jahren die enzymatische Aktivität der Prenyltransferasen CdpC2PT (Mundt & Li S.-M. 2013) und CdpC3PT (Yin *et al.*, 2010) aus *N. fischeri* NRRL181 *in vitro* aufgeklärt werden. Die beiden Prenyltransferasegene *NFIA_043650* (*cdpC2PT*) und *NFIA_074280* (*cdpC3PT*) sind in Genclustern lokalisiert, welche für die putative Biosynthese von zyklischen Dipeptiden verantwortlich sind (Kapitel 4.1.2: Abb. 4-11; Abb. 4-42).

Beide Enzyme sind in der Lage die Umsetzung von cyclo-L-Trp-L-Pro zu katalysieren. Durch die Verwendung von CdpC2PT-His₆ konnte die Produktbildung von cyclo-L-2-tert-Trp-L-Pro beobachtet werden. Die Analyse der Reaktionsgemische mit CdpC3PT-His₆ wies insgesamt drei zusätzliche Produkte neben cyclo-L-Trp-L-Pro. Dabei katalysiert CdpC3PT vorwiegend die reverse C3-Prenylierung von cyclo-L-Trp-L-Pro, zeigte jedoch auch Produkte mit einer reversen Prenylierung an Position C-2 und einer regulären Prenylierung an Position N-1 (Yu *et al.*, 2013). In Zusammenarbeit mit Professor Turner konnte unsere Arbeitsgruppe bereits die Aktivität der NRPS AFUA_8G00170 (im weiteren Verlauf als FtmPS bezeichnet) aus *A. fumigatus* Af293 (Abb. 4-60) durch die heterologe Expression in den Pilzstamm *A. nidulans* TN02A7 aufgeklärt werden. (Maiya *et al.*, 2006)

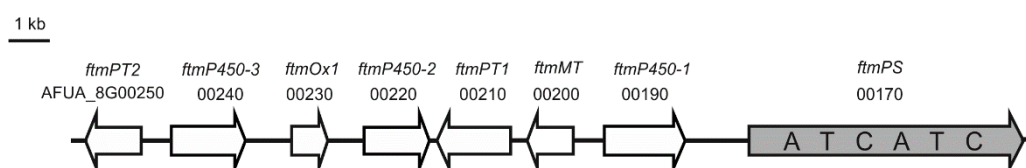


Abb. 4-60: putatives Verruculogen Biosynthesescluster mit der NRPS *ftmPS* aus *A. fumigatus* Af293.

FtmPS katalysiert dabei die Verknüpfung von L-Tryptophan und L-Prolin zu cyclo-L-Trp-L-Pro (Brevianamid F), den ersten Schritt in der Biosynthese von Verruculogen (Abb.1-4). Nachstehend sollte durch die gezielte Koexpression der NRPS *ftmPS* mit der Prenyltransferase *cdpC2PT* oder *cdpC3PT* die Sekundärstoffproduktion untersucht bzw. neue Substanzen *in vivo* produziert werden.

4.3.4.2 Amplifikation von *cdpC2PT* und *cdpC3PT*

Die Amplifikation beider Gene erfolgte durch die Primer KM_043650-1/KM_043650-Stop bzw. CdpC3PT-for/KM_CdpC3PT-Stop mittels High Fidelity Polymerase. Dabei wurde mit den reversen Primern KM_043650-Stop und KM_CdpC3PT-Stop das enthaltene Stop-Codon für eine spätere Expression mit dem TrpC-Terminator nicht mutiert. Als Template dienten die Konstrukte pKM16 (Kapitel 4.1.3.3) und pWY25 (Yin *et al.*, 2010). Die Amplifikation beider Gene konnte erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 4-61: Laufspur 2: *cdpC2PT*, Laufspur 3: *cdpC3PT*).

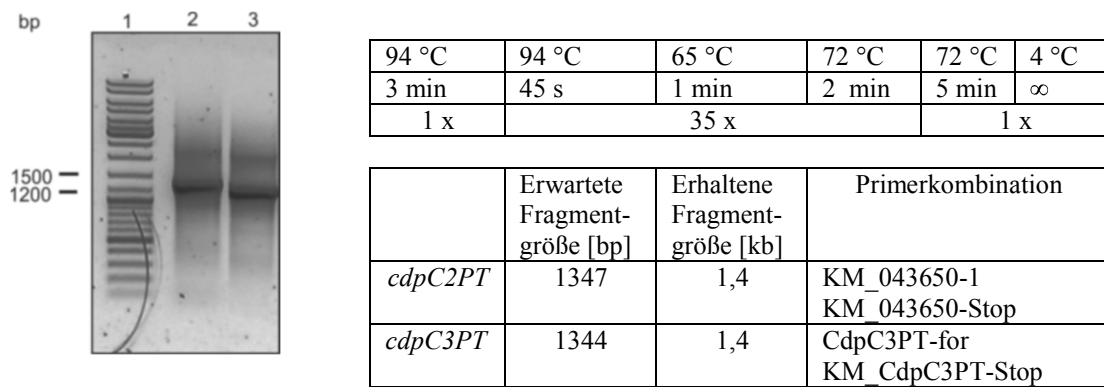


Abb. 4-61: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *cdpC2PT* und *cdpC3PT*. Laufspur 1: DNA-Größenstandard; Laufspur 2: PCR-Produkt von *cdpC2PT*; Laufspur 3: PCR-Produkt von *cdpC3PT*.

4.3.4.3 Klonierung und Transformation

Zur Überprüfung der enthaltenen Gensequenz wurden beide Gene in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy eingebracht und die erhaltenen Klone mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* kontrolliert (Abb. 4-62 B). Nach der Bestätigung des enthaltenen Stop-Codons und der Gensequenz, wurde das Klonierungskonstrukt für *cdpC2PT* als pKM33 und für *cdpC3PT* als pKM34 bezeichnet.

Für eine spätere Koexpression der NRPS *ftmPS* mit den Prenyltransferasen *cdpC2PT* oder *cdpC3PT* in *A. nidulans* TN02A7, sollten nun beide Prenyltransferasegene separat voneinander in den dafür vorgesehenen Expressionsvektor ligiert werden. Der Expressionsvektor pCaW34 wurde von Herrn Carsten Wunsch geschaffen. Das Vektorgrundgerüst besteht aus dem Expressionsvektor pQE60 mit dem Prenyltransferasegen *cdpNPT*. Für die Expression und

entsprechende Selektion in *A. nidulans* TN02A7 wurden von Herrn Carsten Wunsch der konstitutive Promotor *gpdA*, der Terminator TrpC und der Selektionsmarker *pyroA4* eingebracht. Das daraus entstandene Endkonstrukt wies eine Größe von 9469 bp auf. Das Prenyltransferasegen *cdpNPT* wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *NcoI* aus dem Expressionsvektor entfernt und das über Gelaufreinigung gewonnene *BglII*-*NcoI*-Fragment in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt. Das resultierende Konstrukt wurde als pKM32 benannt und diente als Zwischenkonstrukt für die Klonierung von *cdpC2PT* und *cdpC3PT* (Abb. 4-62 A).

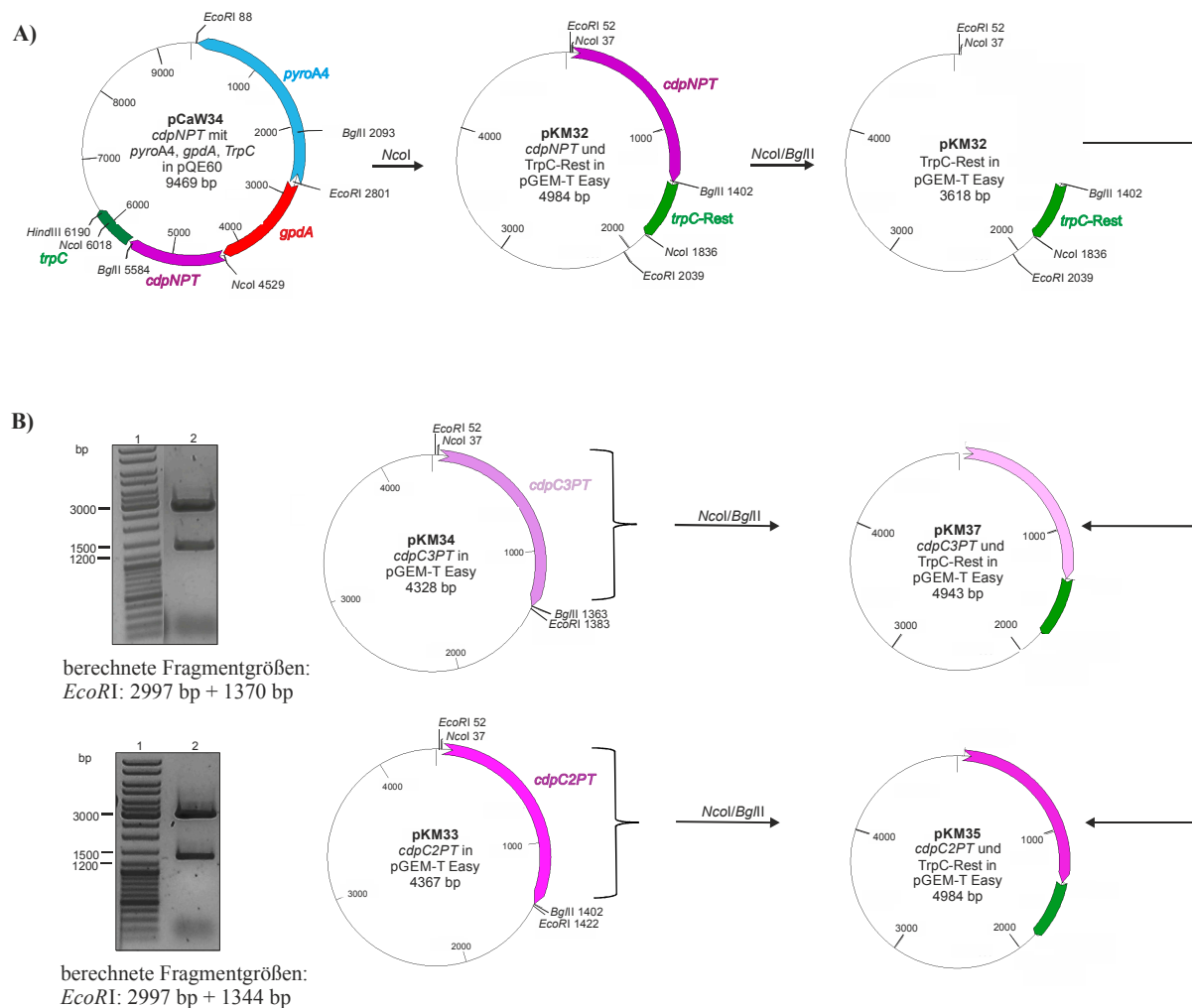


Abb. 4-62: Übersichtsschema zur Klonierung von *cdpC2PT* und *cdpC3PT* mit Überprüfung von pKM33 (*cdpC2PT* in pGEM-T Easy) und pKM34 (*cdpC3PT* in pGEM-T Easy) und die zugehörigen Vektorkarten. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Da das Zwischenkonstrukt pKM32 über eine interne *NcoI*-Schnittstelle an der Position 37 bp verfügte (Abb.4-62), wurde nach Verdau mit *BglII* eine partielle Restriktion (Kapitel 3: Punkt 3.6.7.1) mit *NcoI* durchgeführt und die *NcoI*-Schnittstelle an Position 1836 bp geöffnet.

Die Klonierungskonstrukte pKM33 (*cdpC2PT*) und pKM34 (*cdpC3PT*) wurden ebenfalls durch die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BglII* geschnitten und die erhaltenen Genfragmente mit dem *NcoI*-*BglII* linearisierten Zwischenkonstrukt ligiert. Nach Transformation in den Stamm *E. coli* DH5 α wurden die potentiell positiven Klone angezogen und die Plasmid-DNA durch das Restriktionsenzym *NcoI* kontrolliert (Abb. 4-63). Die resultierenden Konstrukte wurden als pKM35 und pKM37 bezeichnet.

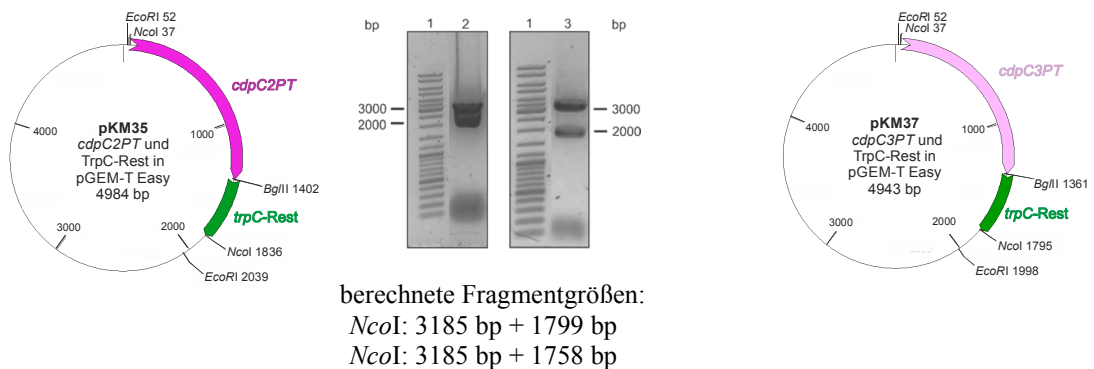


Abb. 4-63: 0,8 %ige Agarosegele zur Überprüfung von pKM35 (*cdpC2PT* in pKM32) und pKM37 (*cdpC3PT* in pKM32) mit den zugehörigen Vektorkarten. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Daraufhin wurden die Konstrukte pKM35 (*cdpC2PT*) und pKM37 (*cdpC3PT*) mit dem Enzym *NcoI* verdaut, die Fragmente mit einer Größe von 1799 bp und 1758 bp über Gelaufreinigung gewonnen und in den bereits vorher *NcoI*-geschnittenen Expressionsvektor pCaW34 eingebracht. Die Plasmid-DNA der zuvor kultivierten Klone wurde mittels *NcoI*-Verdau kontrolliert (Abb. 4-64: Laufspur 2, Abb. 4-65: Laufspur 2) und die positiven Expressionskonstrukte als pKM38 (*cdpC2PT*) und pKM39 (*cdpC3PT*) bezeichnet.

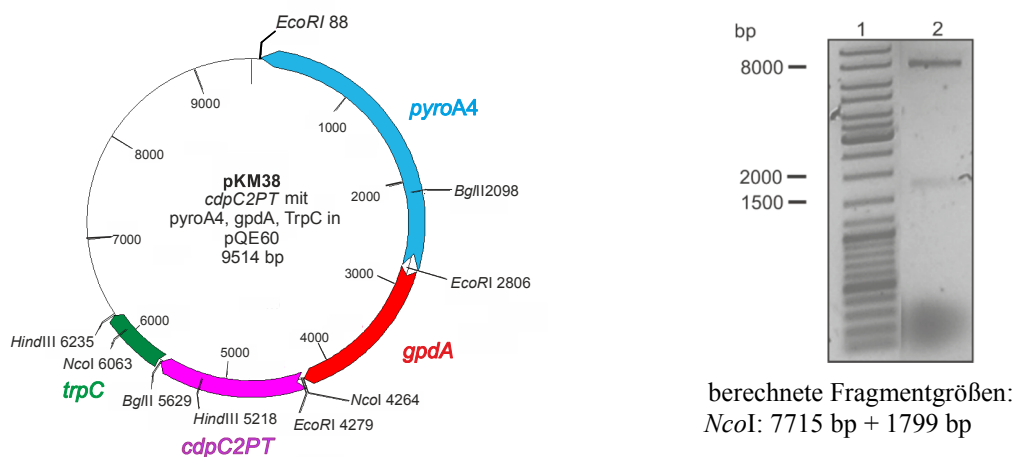


Abb. 4-64: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM38 (*cdpC2PT* im Expressionsvektor) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

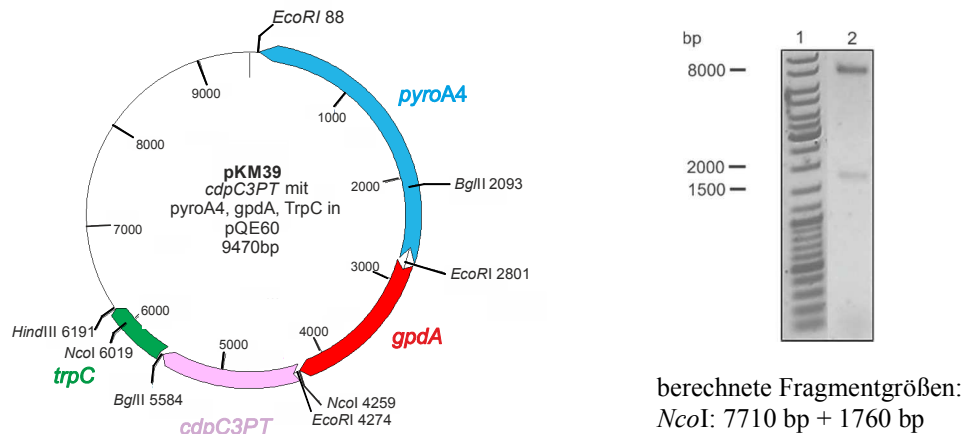


Abb. 4-65: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pKM39 (*cdpC3PT* im Expressionsvektor) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktions-schnittstellen.

4.3.4.4 Protoplastierung von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*)

Das NRPS-Gen *ftmPS* aus *A. fumigatus* wurde durch Herrn Carsten Wunsch in den Pilz *A. nidulans* TN02A7 transformiert und das entstandene NRPS-Produkt als cyclo-L-Trp-L-Pro identifiziert und bestätigt. Für eine Koexpression der NRPS *ftmPS* mit den Prenyltransferasegenen *cdpC2PT* und *cdpC3PT*, wurden die Konstrukte pKM38 und pKM39 mittels Protoplastierung (Kapitel 4.3.2.3) in den Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) transformiert. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der Protoplasten von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) auf Medium ohne Pyridoxin unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Platten wurden unter Lichtausschluß bei 37 °C inkubiert. Der Titer der Protoplasten wurde mittels Neubauer-Zählkammer ($1,6 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$) bestimmt. Nach 3 Tagen konnten von jedem Inkubationsansatz 5 Transformanten auf AMM-Platten vereinzelt werden.

4.3.4.5 Kultivierung und Analyse der Transformanten

Nach der gDNA-Extraktion aller Transformanten (3.6.1.2) wurde die Integration von *cdpC2PT* und *cdpC3PT* in das Genom von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) überprüft. Hierbei konnten durch Amplifikation die Prenyltransferase-Gene mit einer Größe von 1347 bp und 1344 bp in den Transformanten nachgewiesen werden (Abb. 4-66: A: Laufspuren 1-5, Abb. 4-66: B: Laufspuren 2-7). Als Negativkontrolle diente jeweils die gDNA von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) (Abb. 4-66: A: Laufspur 7, Abb. 4-66: B: Laufspur 8) und als Positivkontrolle die gDNA von *N. fischeri* NRRL181 (Abb. 4-66: A: Laufspur 6, Abb. 4-66: B: Laufspur 7).

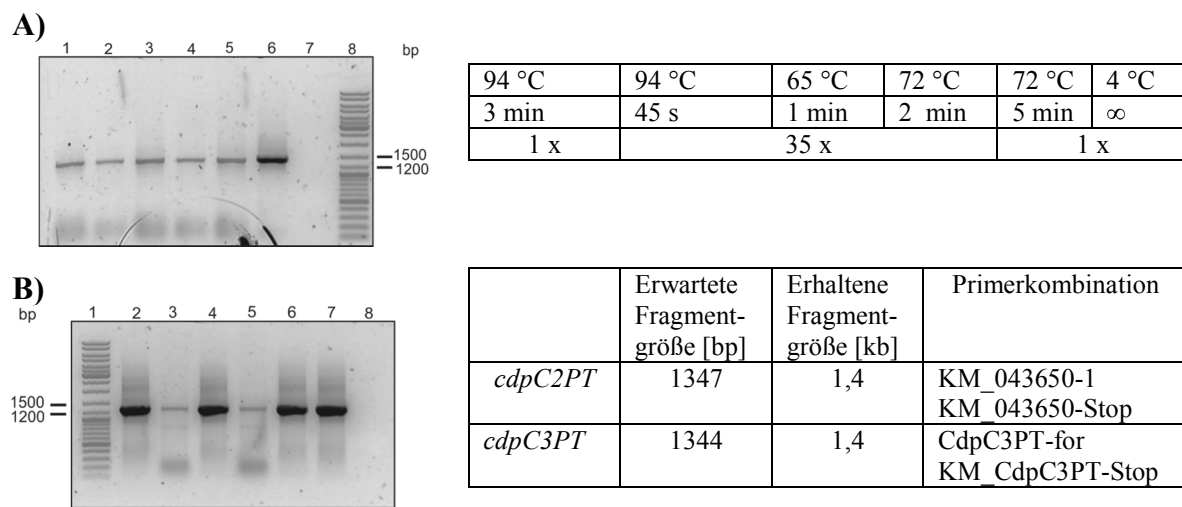


Abb. 4-66: Agarosegele der PCR-Amplifikation von *cdpC2PT* und *cdpC3PT* aus gDNA zur Überprüfung der Transformanten. A) Amplifikation von *cdpC2PT*, 1-5: PCR-Produkt der Transformanten *A. nidulans* KM15-KM19 (*cdpC2PT*), 6: Positivkontrolle *N. fischeri* NRRL181, 7: Negativkontrolle *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*). B) Amplifikation von *cdpC3PT*, 2-6: PCR-Produkt der Transformanten *A. nidulans* KM20-KM24 (*cdpC3PT*), 6: Positivkontrolle *N. fischeri* NRRL181, 8: Negativkontrolle *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*).

Die Kultivierung der Transformanten wurde in 100 ml AMM-Medium für 5 Tage bei 30 °C und 130 rpm in Dunkelheit durchgeführt. Die Kulturen wurden mit 1 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt, die organische Phase bis zur Trockene eingengt und in 1 ml Methanol aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels HPLC (Abb. 4-67). Als Negativkontrollen wurden der Kulturextrakt von dem Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) (Abb. 4-67: F und M) und cyclo-L-Trp-L-Pro mitgeführt (Abb. 4-67: G und N). Die 5 Transformanten für *cdpC2PT* (KM15-KM19) sind in Abb. 4-67 unter A bis E und die für *cdpC3PT* (KM20-KM24) in Abb. 4-67 unter H bis L dargestellt.

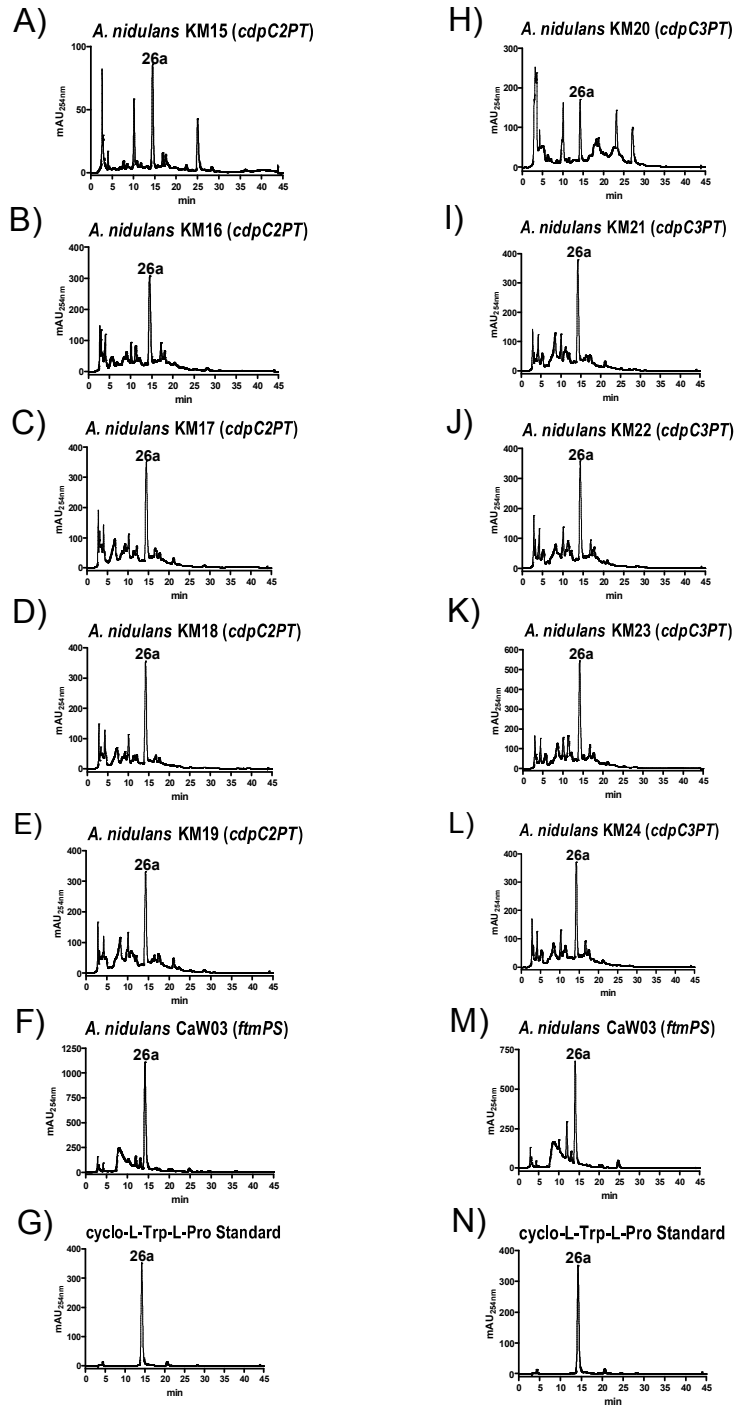


Abb. 4-67: HPLC-Chromatogramme der Transformanten für A-E) *cdpC2PT* (*A. nidulans* KM15-KM19) und H-L) *cdpC3PT* (*A. nidulans* KM20-KM-24). F, M) *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*); G, N) cyclo-L-Trp-L-Pro Standard. Die Kultivierung erfolgte in 100 ml AMM-Medium bei 30 °C und 130 rpm für 5 Tage.

Wie in Abb. 4-67 zu beobachten ist, konnten keine zusätzlichen Peaks mit signifikanter Absorption im Vergleich zu den Negativkontrollen nachgewiesen werden. Mit einer Retentionszeit von 15,8 min wurde lediglich cyclo-L-Trp-L-Pro in allen Transformanten bestätigt. Daraufhin wurden die Transformanten für 5 Tage bei 37 °C und 130 rpm in

Dunkelheit kultiviert. Die Analyse der Kulturextrakte wurde mittels HPLC durchgeführt (Abb. 4-68).

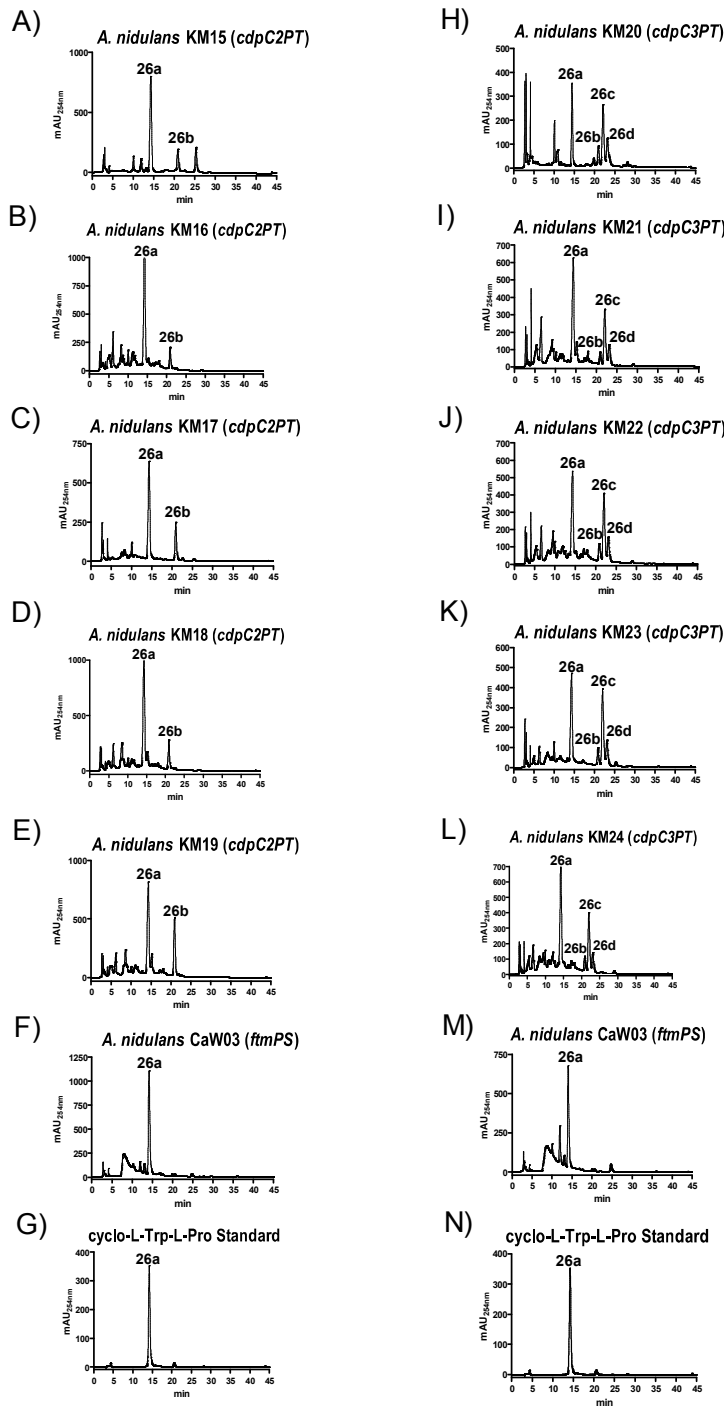


Abb. 4-68: HPLC-Chromatogramme der Transformanten für A-E) *cdpC2PT* (*A. nidulans* KM15-KM19) und H-L) *cdpC3PT* (*A. nidulans* KM20-KM-24). F, M) *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*); G, N) cyclo-L-Trp-L-Pro Standard. Der Standard ist mit a und die Produkte mit b-d bezeichnet. Die Kultivierung erfolgte in 100 ml AMM-Medium bei 37 °C und 130 rpm für 5 Tage.

In den Transformanten mit *cdpC2PT* (Abb. 4-68: A-E) konnte im Vergleich zum Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) (Abb. 4-68: F) und cyclo-L-Trp-L-Pro (Abb. 4-

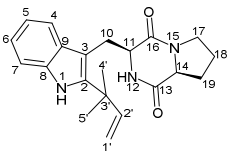
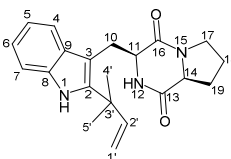
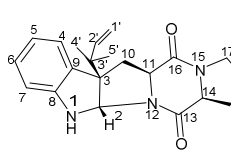
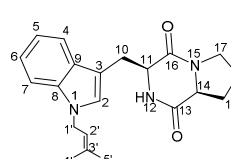
68: G), ein zusätzlicher Peak bei einer Retentionszeit von 20,9 min detektiert werden. Auch bei den *cdpC3PT*-Transformanten (Abb. 4-68: H bis L) wurden deutlich drei neu entstandene Peaks mit Retentionszeiten von 20,8 min; 22,0 min und 23,1 min festgestellt.

4.3.4.6 Strukturaufklärung der entstandenen Sekundärmetabolite

Für die Isolierung der zusätzlichen Sekundärmetabolite (**26b-26d**) wurden insgesamt 2 Liter Kultur von dem Transformanten *A. nidulans* KM19 (*cdpC2PT*) (Abb. 4-68: E) und *A. nidulans* KM24 (*cdpC3PT*) (Abb. 4-68: L) angesetzt und für 5 Tage bei 37 °C und 130 rpm in AMM-Medium inkubiert. Die Kulturen wurden mit 1:1 Ethylacetat ausgeschüttelt, die organische Phase bis zur Trockene eingeeengt und in 1 ml Methanol aufgenommen (Kapitel 3.8.1). Danach erfolgte die Isolierung der einzelnen Produkte mittels HPLC. Aus einem Liter Kultur konnten 3 mg **26b** aus dem *cdpC2PT*-Transformanten *A. nidulans* KM19 gewonnen werden. Die Isolierung der Produkte aus den *cdpC3PT*-Transformanten *A. nidulans* KM24 ergab hingegen eine Ausbeute von 3 mg/l **26b**, 11 mg/l **26c** und 5 mg **26d**. Die Strukturen der Produkte wurden mittels ¹H-NMR (Tab. 4-15) und HR-EI-MS (Tab. 4-156) aufgeklärt. Die ¹H-NMR-Spektren der Produkte befinden sich im Anhang (Abb.7-31 - Abb.7-34). Der Vergleich der ¹H-NMR-Spektren der isolierten Produkte **26b** (in *cdpC2PT*- sowie *cdpC3PT*-Transformant enthalten) mit dem von cyclo-L-Trp-L-Pro (Grundmann & Li 2005) zeigten eindeutig das Vorhandensein von Signalen für eine reverse C2-Prenylierung bei δ_H 5,10 – 5,13 (H-1'), 6,22 (H-2'), 1,57 (3H-4') und 1,56 ppm (3H-5') auf. Zudem zeichneten sich die ¹H-NMR Spektren der Produkte **26b** durch das Fehlen des Dupletts für H-2 aus. Damit konnte die Struktur eindeutig als cyclo-L-C2-dimethylallyl-Trp-L-Pro bestätigt werden. Das Produkt **26c** aus dem *cdpC3PT*-Transformanten wies dagegen Signale für eine reverse Prenylierung an Position C-3 auf und Signale für die Bildung einer chemischen Bindung zwischen C-2 und N-12, wodurch der Indolring und der Diketopiperazinring über einen Fünfering miteinander verknüpft wurden. Somit konnte die Struktur zweifellos als cyclo-C3-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten im ¹H-NMR Spektrum vom Produkt **26d** (*cdpC3PT*-Transformant) Signale für eine reguläre N1-Prenylierung bei δ_H 4,71 (d, H-1'), 5,35 (m, H-2'), 1,86 (s, 3H-4') und 1,76 ppm (s, 3H-5') aufgezeigt werden. Demzufolge konnte die Struktur eindeutig als cyclo-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro bestätigt werden.

Ergänzend dazu, stimmten die gemessenen ¹H-NMR-Daten der isolierten Produkte **26b-26d** gut mit den zuvor publizierten Daten überein (Yin *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013).

Tab. 4-15: ¹H-NMR-Daten der isolierten Produkte von *cdpC2PT*- und *cdpC3PT*-Transformanten.

Produkte aus dem Transformanten <i>A. nidulans</i> KM19 (<i>cdpC2PT</i>)		Produkte aus dem Transformanten <i>A. nidulans</i> KM24 (<i>cdpC3PT</i>)		
 <p>26b in CD₃OD</p>		 <p>26b in CD₃OD</p>	 <p>26c in CD₃OD</p>	 <p>26d in CD₃OD</p>
Position	δ_H [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_H [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_H [ppm] Multiplizität (J [Hz])	δ_H [ppm] Multiplizität (J [Hz])
2	-	-	5,52 s	7,04 s
4	7,47 d (8,0)	7,47 d (8,0)	7,22 d (7,5)	7,57 d (7,8)
5	7,02 ddd (8,0; 7,1; 1,1)	7,02 ddd (8,0; 7,1; 1,1)	6,75 td (7,5; 1,0)	7,02 ddd (8,2; 7,1; 1,1)
6	7,09 ddd (8,0; 7,1; 1,1)	7,09 ddd (8,0; 7,1; 1,1)	7,08 ddd (8,0; 7,6; 1,3)	7,13 ddd (8,2; 7,1; 1,1)
7	7,37 d (8,0)	7,37 d (8,0)	6,62 d (8,0)	7,32 d (8,3)
10	3,65 dd (15,1 4,3) 3,14 dd (15,1 11,2)	3,65 dd (15,1; 4,4) 3,15 dd (15,1; 11,2)	2,51 dd (12,9; 6,4) 2,44 dd (12,9; 11,0)	3,45 dd (15,1; 4,6) ^d 3,25 dd (15,1; 11,1) ^e
11	4,52 ddd (11,2; 4,3; 2,0)	4,53 ddd (11,2; 4,4; 1,9)	4,24 m	4,40 m
14	4,23 ddd (8,5; 6,4; 1,8)	4,23 ddd (9,9; 5,8; 3,1)	4,08 m	3,98 ddd (11,1; 6,3; 1,8)
17	3,62 m 3,54 m	3,61 dd (9,9; 6,6) 3,55 m	3,48 dd (8,8; 3,0)	3,45 m ^d 3,25 m ^e
18	2,01 m 1,95 m ^a	2,02 m 1,94 m ^b	2,04 m 1,89 m ^c	1,96 m 2,01 m ^f
19	2,28 m 1,95 m ^a	2,28 m 1,94 m ^b	2,28 m 1,89 m ^c	2,01 m ^f 2,28 m
1'	5,13 dd (17,5; 1,1) 5,10 dd (10,6; 1,1)	5,13 dd (17,5; 1,1) 5,10 dd (10,6; 1,1)	5,13 dd (17,5; 1,3) 5,11 dd (10,6; 1,3)	4,71 d (6,9)
2'	6,22 dd (17,5; 10,6)	6,22 dd (17,5; 10,6)	6,06 dd (17,4; 10,9)	5,35 tm (7,0)
4'	1,57 s	1,57 s	1,13 s	1,86 s
5'	1,56 s	1,56 s	0,98 s	1,76 s

a-f: Signale mit gleichen Buchstaben sind überlappen

Die Massen der neu entstandenen Produkte aus den *cdpC2PT*- (**26b**) und *cdpC3PT*-Transformanten (**26b**, **26c**, **26d**) wurden zusätzlich durch HR-EI-MS bestätigt (Tab. 4-16, Anhang: Abb.7-27-Abb.7-30). Dabei zeigten alle isolierten Produkte (**26b-26d**) eine molekulare Masse auf, die 68 kDa größer war als die von cyclo-L-Trp-L-Pro auf, was die Prenylierung innerhalb der Struktur bestätigt.

Tab. 4-16: HR-EI-MS-Daten der isolierten Produkte von *cdpC2PT*- und *cdpC3PT*-Transformanten.

Isolierte Produkte		Summenformel	HR-EI-MS Daten		Abweichung (ppm)
			Berechnet	Gemessen	
CdpC2PT	26b	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂	351,1947 [M ⁺]	351,196614	5,51
CdpC3PT	26b	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂	351,1947 [M ⁺]	351,195633	2,71
	26c	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂	351,1947 [M ⁺]	351,193901	-2,21
	26d	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂	351,1947 [M ⁺]	351,193731	-2,70

5. Diskussion

5.1 Die Verruculogen-Prenyltransferase FtmPT3 aus *N. fischeri*

In der vorliegenden Arbeit wurde das putative Prenyltransferasegen *NFIA_093400* aus *N. fischeri* NRRL181 amplifiziert und in den Expressionsvektor pHIS8 kloniert. Nach Überexpression in *E. coli* SoluBL21 Zellen konnte das lösliche Protein His₈-EAW19377 mit einer Konzentration von ca. 3 mg aus einem Liter Kultur aufgereinigt werden. Um die enzymatische Aktivität zu untersuchen, wurde FtmPT3 in Anwesenheit von DMAPP mit allen isolierten Fumitremorgin-Typ Substanzen inkubiert. Dabei stellte sich Verruculogen (**1a**) mit einer Umsetzung von 31 % als bestakzeptiertes Substrat heraus. Daraufhin wurden ebenfalls die Vorstufen Fumitremorgin B (**2a**) und 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C (**3a**), sowie Verruculogen TR-2 (**4a**) und Fumitremorgin C (**5a**) als mögliche Substrate getestet. Fumitremorgin C, welches strukturell durch einen Diketopiperazinring ohne Hydroxygruppen an Position C-12 und C-13 charakterisiert ist, diente als Negativkontrolle und wies keine enzymatische Aktivität mit FtmPT3 auf. Die Enzymassays mit **2a** und **3a** resultierten in Produktpeaks mit einer Umsetzung von jeweils 24 % (**2b**) und 10 % (**3b**). Hingegen dazu konnte **4a** mit 8 % (**4b**) von FtmPT3 umgesetzt werden. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in den kinetischen Parametern wieder. Hier zeigte FtmPT3 die beste Affinität zu Verruculogen mit einem K_M -Wert von 5,7 μM . Außerdem konnte eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 0,08 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und eine Wechselzahl (k_{cat}) von 0,07 s^{-1} festgestellt werden. Dies bestätigt, dass Verruculogen das natürliche Substrat von FtmPT3 ist. Die anderen akzeptierten Substrate zeigten K_M -Werte von 40 μM (**2a**) über 85 μM (**3a**) und 157,5 μM (**4a**) auf. Verruculogen TR-2 wurde bisher nicht als Intermediat in dem Fumitremorgin A-Biosyntheseweg erwähnt, doch vorherige Untersuchungen zu ^{14}C -markiertem TR-2 (Willingale *et al.*, 1983) lassen eine mögliche Rolle von **4a** als Zwischenprodukt in der Biosynthese von Verruculogen vermuten. Diese Tatsache könnte die Akzeptanz von **4a** durch FtmPT3 erklären. Die Isolierung der enzymatischen Produkte von FtmPT3 und die nachstehende Strukturaufklärung mittels ^1H -NMR und HR-ESI-MS zeigten, dass FtmPT3 als eine nicht-aromatische *O*-Prenyltransferase agiert und den letzten Schritt in der Biosynthese von Fumitremorgin A katalysiert. Der putative Fumitremorgin A Biosyntheseweg für *N. fischeri* NRRL181 wurde entsprechend vervollständigt (Abb. 5-1).

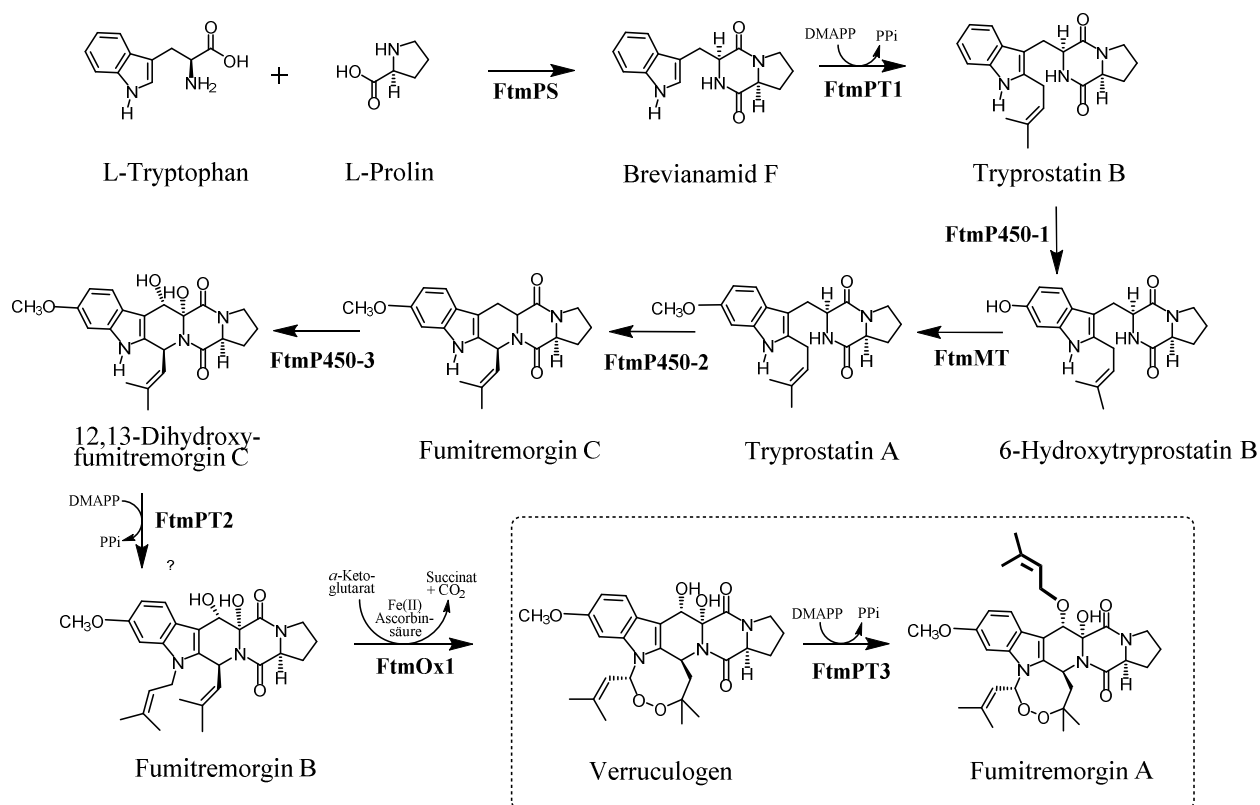


Abb.5-1: Fumitremorgin A-Biosyntheseweg in *N. fischeri* NRRL181 (Mundt *et al.*, 2012). Die gepunktete Linie markiert den in dieser Arbeit aufgeklärten Reaktionsschritt katalysiert durch FtmPT3.

Der Vergleich mit Literaturangaben ergab, dass die meisten bekannten Prenyltransferasen aus Pilzen für eine C- oder N-Prenylierung am Indol- bzw. Indolinring von aromatischen Substraten verantwortlich sind. Dies konnte bereits für die meisten Mitglieder der DMATS Superfamilie demonstriert werden, wie z.B. 7-DMATS (Kremer *et al.*, 2007), 5-DMATS (Yu *et al.*, 2012), CdpNPT (Yin *et al.*, 2007), AnaPT (Yin *et al.*, 2009b) und CTrpPT (Zou *et al.*, 2011). Nach derzeitigen Wissensstand stellt FtmPT3 neben PAPT von *P. amygdali* die einzige Prenyltransferase der DMATS Superfamilie dar, welche die Prenylierung von nicht aromatischen Substraten katalysiert. Für die Prenyltransferase PAPT konnte gezeigt werden, dass sie für die Prenylierung einer 6'-Hydroxygruppe der D-Glucose Einheit von Fusicoccin verantwortlich ist, ein Intermediat in der Fusicoccin A Biosynthese (Noike *et al.*, 2012). Dabei zeigen FtmPT3 und PAPT eine Sequenzidentität von 26 % auf Aminosäureebene zueinander auf.

Um die Produktion von Mykotoxinen des Fumitremorgin-Typs in *N. fischeri* NRRL181 zu untersuchen, wurde der Pilzstamm unter diversen Bedingungen kultiviert und verschiedene Produkte isoliert. Nach der Inkubation in modifizierten Czapek Dox Medium (mCDY) konnten Verruculogen und Fumitremorgin A isoliert und mittels ¹H-NMR identifiziert werden. Die

Kultivierung von *N. fischeri* NRRL181, sowie die Isolierung und Identifizierung der Produkte wurde durch Frau Beate Wollinsky durchgeführt.

Die Analyse der Genomsequenz und der Nachbargene des vorhergesagten Fumitremorgin-Genclusters (Kapitel 1.4.3 Abb.1-3) zeigten das Fehlen eines 3. putativen Prenyltransferasegens. Ausgiebige Untersuchungen der Genomsequenz von *N. fischeri* NRRL181 ergaben das putative Prenyltransferasegen *ftmPT3* auf dem Contig 580 (Sequenz in GenBank mit Accession Nr. AAKE03000020.1), außerhalb des postulierten Fumitremorgin-Clusters (Li 2011). Dies ist ein interessanter Aspekt, da in Pilzen die Gene für einen Biosyntheseweg normalerweise geclustert vorliegen und unter bestimmten Bedingungen gleichzeitig exprimiert werden. Ein Vergleich der Gensequenzen direkt neben *ftmPT3* in *N. fischeri* NRRL181 mit den Genen von *A. fumigatus* Af293 und A1163 auf Aminosäureebene, zeigte hohe Identitäten von 68 % bis 100 % (Abb. 4-1). Wie bereits im Kapitel 4.1.2.1 in der Abb. 4-1 gezeigt worden ist, befinden sich auf der Genomsequenz von *N. fischeri* noch 7 zusätzliche Gene (*NFIA_093430* – *NFIA_093370*), welche keine weiteren Identitäten zu den Genen in *A. fumigatus* Af293 und A1163 oder anderen Pilzen aufzeigen. Obwohl die Endprodukte Verruculogen und Fumitremorgin A aus *A. fumigatus* Af293 isoliert wurden (Afiyatulloev *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 1980), konnte das Vorhandensein eines FtmPT3 Ortholog in *A. fumigatus* bis heute nicht bestätigt werden. Deshalb ist es einleuchtend, dass bis zu den Ergebnissen dieser Arbeit Verruculogen als Endprodukt angenommen wurde. Dennoch könnte eine Insertion von 7 zusätzlichen Genen in *N. fischeri* NRRL181 oder eine Deletion von den Genen aus *A. fumigatus* durch horizontalen Gentransfer entstanden sein, wie es bereits für das ACE1 Cluster von *A. clavatus* (Khaldi *et al.*, 2008) nachgewiesen werden konnte. Das ACE1 Cluster wurde zuerst in dem Pilz *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) identifiziert und besteht aus insgesamt 15 Genen, darunter *ace1* codierend für ein NRPS/PKS-Hybrid, welches vermutlich an der Biosynthese von Avirulenzsignalen in Reispflanzen beteiligt ist (Khaldi *et al.*, 2008). In *A. clavatus* konnten allerdings nur noch 9 der ursprünglich 15 Gene des ACE1 Clusters detektiert werden

Bis heute sind jedoch die grundlegenden Mechanismen evolutionärer Erschaffung und Aufrechterhaltung von Clustern immer noch unverstanden, aber es wird angenommen, dass einige Vorgänge von der starken natürlichen Selektion beeinflusst werden (Khaldi *et al.*, 2008).

5.2 Die reverse C2-Prenyltransferase CdpC2PT aus *N. fischeri*

In der vorliegenden Arbeit wurde das putative Prenyltransferasegen *NFIA_043650* aus *N. fischeri* NRRL181 in den Expressionsvektor pQE60 kloniert, in *E. coli* überexprimiert und das lösliche rekombinante Protein CdpC2PT aufgereinigt. Die biochemische Charakterisierung zeigte die Akzeptanz aller getesteten zyklischen Dipeptide mit Tryptophan-Rest, wie z.B. mit (*S*)-Benzodiazepindion (**6a**) und cyclo-L-Trp-L-Trp (**7a**) als bestakzeptierte Substrate. Die Isolierung von sechs enzymatischen Produkten mit anschließender Strukturaufklärung zeigte, dass CdpC2PT für eine reverse C2-Prenylierung am Indolring der zyklischen Dipeptide verantwortlich ist. Für *N. fischeri* sind bislang noch keine C2-prenylierten Tryptophan-enthaltenen Dipeptide und/oder ähnliche Strukturderivate bekannt. Die intensive Suche nach solchen Substanzen durch eine Kultivierung von *N. fischeri* NRRL181 in verschiedenen Medien mit variierenden Bedingungen und der Produktisolierung blieb bislang erfolglos (Wollinsky und Li, unveröffentlichte Daten). Dies deutet daraufhin das *NFIA_043650* oder verwandte Gene unter den getesteten Laborbedingungen nur schwach oder gar nicht exprimiert werden, diese Tatsache konnte auch für andere Gene in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beobachtet werden (Brakhage 2013). Die Literaturrecherche ergab das Vorhandensein einer Reihe von revers C2-prenylierter zyklischer Dipeptide oder Derivate in Pilzen auf. Dazu zählen u.a. Stephacidine, Notamide und Brevianamide abgeleitet von L-Tryptophan und L-Prolin, Echinuline aus L-Tryptophan und L-Alanin, sowie Fellutanine aufgebaut aus 2 Tryptophan-Molekülen (Ding *et al.*, 2010; Li 2010; Li 2011; Wang *et al.*, 2007a; Williams *et al.*, 2000). Ein C2-prenyliertes (*S*)-Benzodiazepindion (**6b**) oder ähnliche Derivate konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Im Vergleich dazu, dient das Enantiomer (*R*)-Benzodiazepindion als Substrate für die C3-Prenyltransferase AnaPT in der Biosynthese von Acetylaszonalenin, welches bereits aus verschiedenen Pilzstämmen darunter auch *N. fischeri* NRRL181 isoliert werden konnte (Yin *et al.*, 2009b). In der Biosynthese von Stephacidinen, Notamiden und Brevianamiden, wird cyclo-L-Trp-L-Pro (Brevianamid F, **14a**) an Position C-2 des Indolringes revers prenyliert (Ding *et al.*, 2010; Li 2011). Ein Gencluster für die Biosynthese dieser Substanzen und die Prenyltransferasen NotF, NotG und BrePT konnten erst kürzlich identifiziert werden (Ding *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2013). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, wird Brevianamid F nur im geringen Umfang von CpC2PT akzeptiert, was dafür spricht, dass es sich hierbei nicht um das natürliche Substrat handelt.

Echinulin und seine Analoga bilden eine große Gruppe von Pilzmetaboliten, welche strukturell von cyclo-L-Trp-L-Ala (**10a**) abgeleitet sind und sich durch eine mono-, di- oder tri-Prenylierung am Indolring auszeichnen. Eine reverse Prenyleinheit an Position C-2 des Indolrings ist immer existent und folglich muss eine reverse C2-Prenylierung von cyclo-L-Trp-L-Ala stattfinden (Harrison & Quinn 1983; Li 2010; Wang *et al.*, 2007a; Williams *et al.*, 2000). CdpC2PT akzeptiert **10a** mit einem K_M -Wert von 833,7 μM und einer k_{cat} von 0,03 s^{-1} und daher scheint es nicht plausibel, dass das Enzym die Prenylierung von cyclo-L-Trp-L-Ala in der Biosynthese von Echinulinen in der Natur katalysiert. Neben (*S*)-Benzodiazepindion (**6a**), zeigte CdpC2PT eine exzellente Affinität zu dem Substrat cyclo-L-Trp-L-Trp mit einem K_M -Wert von 165,2 μM und einer k_{cat} von 0,30 s^{-1} . Der Vergleich der kinetischen Daten von CdpC2PT gegenüber dem monoprenylierten cyclo-L-Trp-L-Trp (**7b**) mit anderen Enzymen aus dem Sekundärmetabolismus zeigte, dass sie im normalen Bereich lagen. Dies könnte für eine Rolle von CdpC2PT in der Biosynthese von Fellutaninen sprechen, welche aus dem Pilz *P. fellutanum* isoliert wurden (Kozlovsky *et al.*, 2001b). Für die Biosynthese des Endproduktes Fellutanin D, dessen Stereochemie von der gleichen Arbeitsgruppe revidiert wurden ist (Kozlovsky *et al.*, 2001a), sind mindestens 3 Enzyme von essentieller Bedeutung. Dazu zählt ein Enzym für die Verknüpfung der 2 Tryptophan-Moleküle zu dem zyklischen Dipeptid cyclo-L-Trp-L-Trp, mindestens ein weiteres Enzym für die reverse Prenylierung an Position C-2 von beiden Indolringen und ein Enzym welches für die Fusion der Indolringe mit dem Diketopiperazinring verantwortlich ist. Die Formation des Diketopiperazinringes könnte hierbei durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase katalysiert werden (Ames & Walsh 2010; Maiya *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009b). Die Analyse des putativen Genclusters mit CdpC2PT zeigt das Vorhandensein einer nichtribosomalen Peptidsynthetase NFIA_043670 auf, welche durch eine bimodulare Struktur gekennzeichnet ist (Abb. 4-11, Tab. 4-3). Die *in silico* Vorhersage (Prieto *et al.*, 2012) schlug eine mögliche Spezifität für Prolin und Tyrosin vor, welche eindeutig von den erhaltenen CdpC2PT-Ergebnissen abweicht. Denn Prolin- und Tyrosin-enhaltene Dipeptide konnten nur sehr schwach durch CdpC2PT umgesetzt werden. Dieser Widerspruch könnte daher resultieren, dass die meisten Vorhersageprogramme auf Daten von Bakterien basieren. Die Analyse der Aminosäuren innerhalb der A-Domänen (Röttig *et al.*, 2011) ergab einen NRPS-Code für die A₁-Domäne mit G-M-I-L-V-A-A-G-I-K und der A₂-Domäne mit D-A-L-F-C-G-S-V-V-K. Ein Vergleich mit anderen bekannten Peptidsynthetasen aus Pilzen (NRPS, NRPS-ähnlich) zeigte eine Spezifität der NRPS NFIA_043670 für Anthranilsäure (A₁-Domäne) und Ähnlichkeiten zu CpaA aus *A. flavus* auf (Seshime *et al.*, 2009), welche in der Lage ist Tryptophan (A₂-Domäne) in Cyclopiazonsäure

einzubauen (Kalb *et al.*, 2013; Steinchen *et al.*, 2013). Die Tryptophan-Vorhersage für die NRPS NFIA_043760 stimmte dabei mit der Akzeptanz von Tryptophan-haltigen zyklischen Dipeptiden durch die Prenyltransferase CdpC2PT überein.

Direkt zwischen den beiden Genen, welche für CdpC2PT und die NRPS codieren, konnte außerdem ein putatives Gen *NFIA_043660* mit Sequenzidentitäten zu Aminooxidasen identifiziert werden, welches für die Fusion beider Indolringe mit dem Diketopiperazinringsystem verantwortlich sein könnte. Schlussfolgernd daraus, wurde ein putativer Fellutanin-Biosyntheseweg in *N. fischeri* NRRL181 postuliert (Abb.5-2).

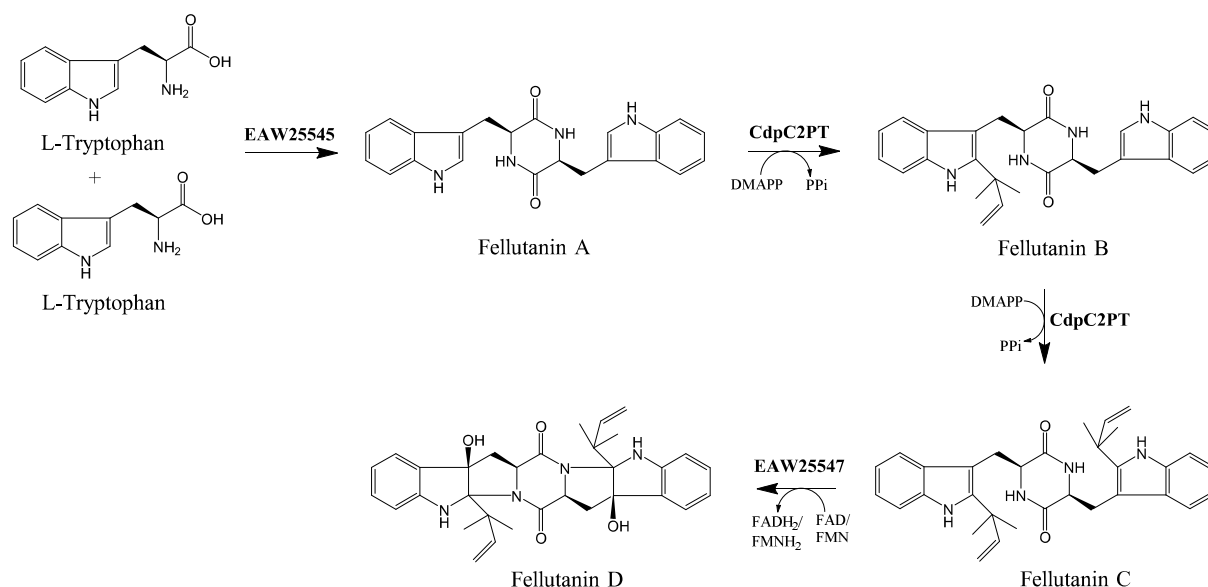


Abb.5-2: Putativer Fellutanin D Biosyntheseweg von *N. fischeri* NRRL181. Abkürzungen: DMAPP, Dimethylallyldiphosphat; PPi, Pyrophosphat; FAD⁺/FADH₂, Flavinadenindinukleotid; FMN⁺/FMNH₂, Flavinmononukleotid.

5.3 Die putative Fellutanin-Aminooxidase EAW25547 aus *N. fischeri*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Gen *NFIA_043660* aus *N. fischeri* NRRL181 codierend für eine putative Aminooxidase im Hinblick auf eine mögliche Aktivität in der Fellutanin D-Biosynthese untersucht werden. Das Gen *NFIA_043660* konnte mit einer Größe von 1395 bp durch das High Fidelity PCR-Kit von Roche von der gDNA amplifiziert werden. Nach der Klonierung in den Expressionsvektor pQE60, erfolgten mehrere Versuche zur Expression von EAW25547-His₆ in den *E. coli* Stämmen M15 [pREP4], SG13009 und XL1-Blue MRF^c. Die getesteten Expressionsbedingungen wurden dabei hinsichtlich der Inkubationsdauer und -Temperatur, sowie der verwendeten IPTG-Konzentration variiert. Nach der Inkubation in

E. coli SG13009-Zellen in 100 ml LB-Medium und der Induktion mit 0,2 mM IPTG für 16 h bei 22 °C, konnte in der Elutionsfraktion von EAW25547-His₆ eine Proteinbande bei ca. 55 kDa beobachtet werden, die mit dem theoretischen Molekulargewicht von 52,5 kDa übereinstimmt. Um eine mögliche Beteiligung der Aminooxidase innerhalb der Fellutanin D-Biosynthese festzustellen, wurden verschiedene Enzymassays angesetzt. Als Substrate dienten sowohl cyclo-L-Trp-L-Trp in Anwesenheit von CdpC2PT (Tandeminkubation), als auch das mono- und di-prenylierte cyclo-L-Trp-L-Trp Produkt von CdpC2PT. Die Analyse mittels HPLC wies jedoch keine Enzymaktivität auf. Die Kultivierung wurde daraufhin unter den gleichen Bedingungen wiederholt, dabei fungierte der pQE60-Leervektor als Negativkontrolle. Die zuvor beobachtete Bande in Höhe von ca. 55 kDa konnte reproduziert werden, allerdings war diese auch bei dem Leervektor vorzufinden. Auch die Gewinnung des Rohextraktes sowie des Zellextraktes zeigte keine mögliche Überproduktion von EAW25547-His₆ in der Membranfraktion auf. Die Klonierung in ein anderes Vektorsystem (pHIS8) und die Transformation in den *E. coli* BL21 (DE3) Stamm resultierte ebenfalls in keiner Überproduktion des abgeleiteten Proteins. Die Wiederholung der Expressionsversuche bei veränderten Kultivierungsbedingungen, wie z.B. niedrigerer Kultivierungstemperatur, verringerter IPTG-Konzentration oder verkürzter Inkubationsdauer führte ebenfalls zu keinem Erfolg. Dies lässt auf eine fehlerhafte Gensequenz schließen. Deshalb wurde das Gen aus der cDNA von *N. fischeri* NRRL181 amplifiziert und in pGEM-T Easy kloniert. Die anschließende Sequenzierung bestätigte jedoch die verwendete Gensequenz. Daher kann vermutet werden, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt keine passenden Expressionsbedingungen gefunden werden konnten.

5.4 Die putativen Prenyltransferasen EAW21072 aus *N. fischeri* und EAW09999 aus *A. clavatus*

Das putative Prenyltransferase-Gen *NFIA_062330* wurde aus der gDNA von *N. fischeri* NRRL181 amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE60 kloniert. Insgesamt konnten ca. 3 mg EAW21072-His₆ aus einem Liter Kultur isoliert werden. Um das natürliche Substrat für EAW21072 ausfindig zu machen, wurde eine Vielzahl an verschiedener Substanzen in Enzymassays in Anwesenheit von DMAPP, FPP oder GPP eingesetzt und inkubiert. Dabei wurden u.a. aromatische Aminosäuren, zyklische Dipeptide, sowie Xanthon-, Naphthalin oder Indolderivate als mögliche Substrate getestet. Nach der Analyse der Enzymassays mit Hilfe der

HPLC konnte jedoch bislang noch keine enzymatische Aktivität detektiert werden. In unserem Arbeitskreis konnte bereits für die Gene FgaOx3 aus *A. fumigatus* und EasA aus *C. purpurea* gezeigt werden, dass orthologe Gene aus verschiedenen Pilzstämmen einerseits in einer aktiven bzw. inaktiven Form vorliegen können (Matuschek *et al.*, 2011; Matuschek *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Tatsache wurden intensiv Sequenzanalysen zu dem Prenyltransferasegen *NFIA_062330* durchgeführt. Dabei konnte mit einer Identität von 62 % auf Aminosäureebene ein orthologes Gen *ACLA_042210* aus *A. clavatus* NRRL1 identifiziert werden. Der Gensequenz-Vergleich der Nachbar-Gene zeigte dabei keine weiteren signifikanten Identitäten zueinander auf. Das orthologe Gen *ACLA_042210* wurde aus gDNA von *A. clavatus* NRRL1 amplifiziert und in den Zielvektor pQE60 eingebracht. Nach erfolgreicher Überexpression in *E. coli* und der anschließenden Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie, konnten insgesamt ungefähr 6 mg EAW09999-His₆ gewonnen werden. Daraufhin wurden ebenfalls verschiedene Substanzen in Enzymassays in Anwesenheit von DMAPP, FPP oder GPP eingesetzt und inkubiert. Es wurden u.a. aromatische Aminosäuren, zyklische Dipeptide, sowie Xanthon-, Naphthalin oder Indolderivate als mögliche Substrate getestet. Die Analyse der Enzymassays per HPLC zeigte jedoch bis jetzt keine Enzymaktivität auf. Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Proteinen zeigte Sequenzidentitäten von jeweils 35 % mit zwei weiteren Prenyltransferasen BAE61387 aus *A. oryzae* RIB40 und EIT77187 aus *A. flavus* NRRL 3357 mit noch unbekannter Funktion auf. Zudem konnte die Analyse der Nachbargene keine Rückschlüsse auf ein putatives Substrat geben. Im genetischen Kontext von *ACLA_042210* und *NFIA_062330* konnte keine direkt angrenzende NRPS oder PKS identifiziert werden, deren modularer Aufbau eventuell Aufschluss auf das natürliche Substrat geben könnte. Es konnten lediglich Gene codierend für putative Enzyme wie Decarboxylasen, Esterasen, Oxidoreduktasen, Dehydrogenasen oder Membranproteine (Kapitel 4.1.4: Tab. 4-6; Kapitel 4.1.5: Tab. 4-9), nachgewiesen werden, die aber keine weiteren Hinweise geben. Dabei besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den putativen Prenyltransferasen EAW21072 und EAW09999 möglicherweise um Enzyme handelt, welche eine sehr hohe Substratspezifität aufweisen. Aufgrund der Lokalisation beider Gene in einem nicht geclusterten Bereich, kann jedoch eine Beteiligung an einem Biosyntheseweg, codiert durch ein spezifisches Gencluster mit Position auf einem anderen Chromosomenbereich, nicht ausgeschlossen werden.

5.5 Die nichtribosomalen Peptidsynthetasen Pc21g15480 aus *P. chrysogenum* und NFIA_074300 aus *N. fischeri*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte u.a. die Verknüpfung von L-Tryptophan und L-Histidin zu cyclo-L-Trp-L-His, katalysiert durch die NRPS Pc21g15480 (Ali *et al.*, 2013; Garcia-Estrada *et al.*, 2011) *in vivo* nachgewiesen und die erhaltenen Transformanten für eine Kombination mit weiteren Enzymen bereitgestellt werden. Hierfür wurde das codierende Gen hinter den *gpdA*-Promotor in den Expressionsvektor pJW24 kloniert und somit das Expressionskonstrukt pKM36 geschaffen. Nach erfolgter Transformation des Pilzes *A. nidulans* TN02A7 mit dem Expressionskonstrukt, konnten durch PCR-Screening drei Transformanten identifiziert werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit das NRPS-Gen *Pc21g15480* ektopisch in das Genom integriert hatten. Ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche Insertion des Gens *Pc21g15480* war die nachfolgende Untersuchung der Sekundärstoffproduktion der Transformanten, bei der zwei zusätzliche Peaks detektiert werden konnten. Dabei zeigte der 1. Peak die gleiche Retentionszeit von 9,9 min wie der cyclo-L-Trp-L-His Standard auf und konnte mittels ¹H-NMR und ESI-MS Analysen eindeutig als cyclo-L-Trp-L-His identifiziert werden. Durch die heterologe Expression des Gens *Pc21g15480* in *A. nidulans* TN02A7 konnte somit die postulierte Funktion der NRPS von Ali *et al.*, 2013 und Garcia-Estrada *et al.*, 2011 bestätigt werden. Die erhaltenen Transformanten *A. nidulans* KM01-KM03 (*Pc21g15480*) stehen nun für die Koexpression mit weiteren Genen bereit.

Weiterführend sollte in der vorliegenden Arbeit die Funktion des homologen Gens *NFIA_074300* ebenfalls durch die heterologe Expression in *A. nidulans* aufgeklärt werden. Die *in silico* Vorhersage für die NRPS *NFIA_074300*, anhand der spezifischen Aminosäuren innerhalb der A-Domänen, ergab einen NRPS-Code von D-S-L-E-L-V-A-V-V-K (A₁-Domäne) und D-I-A-M-I-G-S-M-Y-K (A₂-Domäne) (Röttig *et al.*, 2011). Der Vergleich mit anderen bekannten Peptidsynthetasen (NRPS, NRPS-ähnlich) zeigte leider keine Übereinstimmung bzw. Ähnlichkeit mit anderen NRPS-Codes der A-Domänen auf (Kalb *et al.*, 2013). Interessanterweise wies dieselbe Analyse bei der homologen NRPS *Pc21g15480* den gleichen NRPS-Code wie für die NRPS *NFIA_074300* auf (A₁: D-S-L-E-L-V-A-V-V-K; A₂: D-I-A-M-I-G-S-M-Y-K). Dies deutet daraufhin, dass die NRPS *NFIA_074300* ebenfalls die Synthese von cyclo-L-Trp-L-His katalysiert.

Nach erfolgreicher Transformation des Wildtypes *A. nidulans* TN02A7 mit dem Expressionskonstrukt pKM10 und der anschließenden Selektion, konnten mehrere Transformanten gewonnen werden. Nachstehend wurde die gDNA aller Transformanten

isoliert und mittels PCR-Screening untersucht. Dabei konnten 10 Transformanten nachgewiesen werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit die NRPS *NFIA_074300* in das Genom durch ektopische Integration aufgenommen haben. Die Analyse der Sekundärstoffproduktion per HPLC zeigte, dass lediglich der Transformant *A. nidulans* KM12 (*NFIA_074300*) einen dominanten Peak mit einer Retentionszeit von 24,8 min im Vergleich zum Wildtyp *A. nidulans* TN02A7 aufzeigte. Diese Substanz konnte mit Hilfe der ¹H-NMR und MS Analyse eindeutig als Pseurotin A identifiziert werden. Entgegen den Erwartungen konnte kein cyclo-L-Trp-L-His oder Derivate davon beobachtet werden. Durch bereits zuvor publizierte Ergebnisse war bereits bekannt, dass es sich bei Pseurotin A um das Endprodukt eines NRPS/PKS-Hybrides aus einem Gencluster in *A. fumigatus* Af293 (Maiya *et al.*, 2007) handelt. Um zu untersuchen, in wie weit ein Homolog des NRPS/PKS-Genhybrides *AFUA_8G00540* auch in *A. nidulans* enthalten ist, erfolgte der Vergleich des abgeleiteten Genproduktes mit den sequenzierten Genomsequenzen anderer Pilze. Dabei konnte mit einer 86 %ige Sequenzidentität auf Aminosäureebene ein NRPS/PKS-Genhybrid *ACLA_004770* in *A. clavatus* NRRL1 identifiziert werden. Nachdem das Genhybrid anscheinend nicht in *A. nidulans* vorhanden war, lag die Vermutung nahe, dass der Wildtyp durch entweder *A. clavatus* oder *A. fumigatus* kontaminiert war. Daraufhin wurden mehrere PCR-Versuche mit verschiedenen Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt, aber es konnte keine vorliegende Kontamination festgestellt werden. Da es sich bei dem verwendeten Wildtyp *A. nidulans* TN02A7 um einen nicht sequenzierten Pilzstamm handelt, konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass ein NRPS/PKS-Genhybrid verantwortlich für die Pseurotin A Produktion im Genom vorlag. Folglich wurden Primer anhand der vorliegenden Gensequenzen von *A. fumigatus* und *A. clavatus* synthetisiert, jedoch konnte kein Amplifikationsprodukt erhalten werden.

Die Produktion von cyclo-L-Trp-L-His oder eines anderen zyklischen Dipeptides durch das homologe Gen *NFIA_074300* konnte *in vivo* nicht bestätigt werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass deren Biosynthese in dem Transformanten gestört wird. Andererseits konnte für den Wildtyp zuvor keine Pseurotin A Produktion beobachtet werden. Ein ähnliches Phänomen konnte bereits in der ΔfgaP450-Deletionsmutante von *Penicillium commune* (*P. commune*) NRRL2033 nachgewiesen werden, welche im Vergleich zum Wildtyp unerwarteterweise Meleagrin produzierte (Steffan 2009). Unbekannt bleibt, warum der Transformant Pseurotin A produziert. Eine mögliche Ursache hierfür, könnte eine fehlerhafte Integration der NRPS in die Genomsequenz sein, wodurch ein Cluster beschädigt wurde und andere Endprodukte die Folge waren. Ebenfalls denkbar ist, dass die Anwesenheit von

NFIA_074300 in dem Transformanten einen Einfluss auf die Produktion weiterer Sekundärmetabolite in *A. nidulans* TN02A7 haben könnte und somit eine Expression des Pseurotin A-Biosynthesegenclusters ermöglicht wurde. Denn die Integration eines Gens kann zu einem „cross talk“ zwischen 2 biosynthetischen Genclustern führen, die auf 2 unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind und die Produktion neuer Sekundärmetabolite hervorrufen (Bergmann *et al.*, 2010). Es wäre jedoch auch denkbar, dass das Pseurotin A Gencluster in *A. nidulans* TN02A7 vorhanden ist und durch die verwendeten Primer nur nicht detektiert werden konnte. Das Vorhandensein eines Genclusters führt nicht unbedingt zur Bildung eines nachweisbaren Produktes. So besitzt z.B. der in der Lebensmittelindustrie häufig angewandte Pilz *A. oryzae* das Gencluster für die Aflatoxin-Biosynthese (Machida *et al.*, 2005), ist jedoch für dessen Produktion nicht bekannt. Die Gründe dafür sind bis heute noch eher unverstanden, jedoch scheinen sie das Ergebnis einer Deletion zu sein, welche zur Inaktivierung einiger Gene innerhalb des Biosyntheseweges führte (Kusumoto *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 1999).

5.6 Die gezielte *in vivo* Koexpression der NRPS *ftmPS* mit den Prenyltransferasen *cdpC2PT* oder *cdpC3PT*

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die gezielte Koexpression der Prenyltransferasen CdpC2PT oder CdpC3PT mit der NRPS FtmPS die Sekundärstoffproduktion in dem Pilz *A. nidulans* analysiert werden. Die Verknüpfung von L-Tryptophan und L-Prolin zu cyclo-L-Trp-L-Pro katalysiert durch die NRPS FtmPS (Maiya *et al.*, 2006) konnte bereits durch Herrn Carsten Wunsch *in vivo* reproduziert werden. Für eine heterologe Expression, wurde die Klonierung der Gene *NFIA_043650* (*cdpC2PT*) und *NFIA_074280* (*cdpC3PT*) in den Expressionsvektor pCaW34 durchgeführt. Das Expressionskonstrukt wies dabei den *gpdA*-Promotor, den *pyroA4*-Selektionsmarker und den *TrpC*-Terminator auf. Daraufhin erfolgte die Transformation in den Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) von Herrn Wunsch. Durch PCR-Screening konnten jeweils 5 Transformanten bestätigt werden, welche die Prenyltransferasegene in das Genom integriert hatten. Die Analyse der Sekundärstoffproduktion nach Kultivierung bei 30 °C, zeigte jedoch keine zusätzliche Produktbildung neben cyclo-L-Trp-L-Pro auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Gene *NFIA_043650* und *NFIA_074280* unter den verwendeten Bedingungen gar nicht oder nur sehr schwach exprimiert wurden.

Die Erforschung des 2004 in *A. nidulans* identifizierten globalen Regulators LaeA (loss of *aflR* expression-A) (Bok & Keller 2004) zeigte erstmals die übergeordnete Funktion von regulatorischen Elementen im Zusammenhang mit der Sekundärstoffproduktion auf. In Pilzen wird die Produktion von Sekundärmetaboliten nicht nur durch spezifische Transkriptionsfaktoren oder globalen Transkriptionsregulatoren reguliert, sondern auch durch Heteromerkomplexe (Yin & Keller 2011). Dazu zählt z.B. der Velvet-Komplex in dem auch das LaeA Protein involviert ist, welcher u.a. die Sekundärstoffproduktion über Licht und Dunkelheit reguliert (Bayram *et al.*, 2008). In mehreren Studien wurde die Aktivität des LaeA Regulators in Dunkelheit sowie bei einer Temperatur von 37 °C belegt (Bok *et al.*, 2005; Bok & Keller 2004). Diesbezüglich wurde die Kultivierung der Transformanten bei 37 °C und unter Lichtausschluß wiederholt. Die Analyse der Sekundärstoffproduktion mittels HPLC zeigte das Vorhandensein von mehreren zusätzlichen Produktpeaks auf. In den Transformanten von *cdpC2PT* konnte die Bildung von cyclo-2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (**26b**) mittels ¹H-NMR und HR-EI-MS nachgewiesen werden. Dies korreliert hervorragend mit den zuvor veröffentlichten Daten, die durch Reaktionsansätze mit dem rekombinanten Protein CdpC2PT-His₆ *in vitro* (Mundt & Li S.-M. 2013) mitunter im Rahmen dieser Arbeit erbracht worden sind. Es zeigt das CdpC2PT auch *in vivo* die reverse Prenylierung von zyklischen Dipeptiden an Position C-2 katalysiert. Die Untersuchung des putativen Genclusters mit *cdpC2PT* zeigt das Vorhandensein einer nichtribosomalen Peptidsynthetase *NFIA_043670* auf, welche durch eine lineare Domänen-Struktur (ATCAMTC) gekennzeichnet ist. Dies deutet darauf hin, dass die NRPS die Synthese eines zyklischen Dipeptides katalysiert. Die zusätzliche Methylierungseinheit innerhalb des NRPS-Motifs könnte dabei für die posttranslationalen Modifikation der entsprechenden Aminosäure vor dem Elongationsprozess katalysieren (Billich & Zocher 1987; Zocher *et al.*, 1982).

Die Untersuchung der *cdpC3PT*-Transformanten auf enthaltene Sekundärmetabolite zeigte 3 zusätzliche Produktpeaks auf (**26b-26d**), welche durch ¹H-NMR und HR-EI-MS als cyclo-2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro, cyclo-3-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro und cyclo-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (1:4:2) identifiziert werden konnten. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen dabei mit den Daten überein, welche zuvor *in vitro* durch Reaktionsansätze mit dem rekombinanten Protein CdpC3PT gewonnen werden konnten (Yu *et al.*, 2013). Die unterschiedlichen Prenylierungspositionen der erhaltenen Produkte, können dabei wahrscheinlich auf eine dissoziative, elektrophile Alkylierung am Tryptophan zurückgeführt werden. Dies konnte bereits für SirD und 4-DMATS postuliert werden (Rudolf *et al.*, 2013; Rudolf & Poulter 2013).

Für das homologe Gen *Pc21g15480* aus *P. chrysogenum*, welches eine Sequenzübereinstimmung von 60 % auf Aminosäureebene zu dem NRPS-Gen *NFIA_074300* aufzeigt, konnte die Synthese von cyclo-L-Trp-L-His durch „*knock out*“ Experimente nachgewiesen werden (Ali *et al.*, 2013; Garcia-Estrada *et al.*, 2011). Dies konnte hingegen für die NRPS *NFIA_074300* durch Versuche innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Da für die Entwicklung neuer Arzneistoffe, die Herstellung neuer Stoffgruppen u.a. durch die geschickte Neukombination von Genen mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren ein interessantes Werkzeug ist, sind die resultierenden Ergebnisse dieser Arbeit von enormer Bedeutung. Die durch die NRPS-Transformanten erhaltenen Peptidstrukturen können durch die gezielte Koexpression mit weiteren Biosynthesegenen aus den verschiedensten Genclustern modifiziert werden, z.B. durch weitere Prenyltransferasen für Prenylierungen, Methyltransferasen für Methylierungen oder Gene für Cytochrom P450-Enzyme für Hydroxylierungen, oder Oxidation bzw. Reduktion. Die Vorarbeiten in unserem Arbeitskreis haben gezeigt, dass eine Vielzahl der genannten Pilzenzyme eine breite Substratspezifität aufweisen (Wollinsky *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2011; Yu & Li 2012) und somit eine Reihe von Analoga des natürlichen Substrats akzeptieren. Daher kann erwartet werden, dass allein durch die gezielte Kombination von einem NRPS-Gen mit verschiedenen Prenyltransferasegenen diverse Strukturen erhalten werden können. Die angewandte Methode der *in vivo* Expression bietet dabei den Vorteil, dass die akkumulierten Sekundärstoffe in höherer Konzentration vorliegen und direkt für weitere Anwendungen gewonnen werden können. Durch das geplante Einbringen von weiteren Genen in den bereits erhaltenen Transformanten, können die strukturelle und damit auch die biologische Vielfalt der hergestellten Substanzen deutlich erhöht werden.

6. Referenzen

Adrio, J. L. D. A. L. (2003). Fungal biotechnology. *Int. Microbiol.* **6**, 191-199.

Afiyatullo, S. S., Kalinovskii, A. I., Pivkin, M. V., Dmitrenok, P. S. & Kuznetsova, T. A. (2005). Alkaloids from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Natur. Comp.* **41**, 236-238.

Ali, H., Ries, M., Nijland, J. G., Lankhorst, P. P., Hankemeier, T., Bovenberg, R. A., Vreeken, R. J. & Driessen, A. J. (2013). A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS One* **8**, e65328.

Ames, B. D. & Walsh, C. T. (2010). Anthranilate-activating modules from fungal nonribosomal peptide assembly lines. *Biochemistry* **49**, 3351-3365.

Andersen, B., Smedsgaard, J. & Frisvad, J. C. (2004). *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *J. Agric. Food. Chem.* **52**, 2421-2428.

Arai, K., Kimura, K., Mushiroda, T. & Yamamoto, Y. (1989). Structures of fructigenines A and B, new alkaloids isolated from *Penicillium fructigenum* Takeuchi. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2937-2939.

Archer, D. B. & Dyer, P. S. (2004). From genomics to post-genomics in *Aspergillus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 499-504.

Ashby, M. N., Kutsunai, S. Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. & Edwards, P. A. (1992). COQ2 is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4128-4136.

Barcus, A. L., Burdette, S. D. & Herchline, T. E. (2005). Intestinal invasion and disseminated disease associated with *Penicillium chrysogenum*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **4:21**.

Barkai-Golan, R. & Paster, N. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *J. World Mycot.* **1**, 147-159.

Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W. et al. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**, 1504-1506.

Bergmann, S., Funk, A. N., Scherlach, K., Schroeckh, V., Shelest, E., Horn, U., Hertweck, C. & Brakhage, A. A. (2010). Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8143-8149.

Bergmann, S., Schumann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. (2007). Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 213-217.

- Biesebeke, R. T. & Record, E. (2008).** Scientific advances with *Aspergillus* species that are used for food and biotech applications. *Microbes. Environ.* **23**, 177-181.
- Billich, A. & Zocher, R. (1987).** Enzymatic synthesis of cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **262**, 17258-17259.
- Birch, A. J. & Farrar, K. R. (1963).** Biosynthesis. XXXIII. Incorporation of tryptophan into echinulin. *J. Chem. Soc.* 4277-4278.
- Blaschko, H. (1974).** The natural history of amine oxidases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **70**, 83-148.
- Bok, J. W., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. & Keller, N. P. (2005).** LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot. Cell* **4**, 1574-1582.
- Bok, J. W. & Keller, N. P. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* **3**, 527-535.
- Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N. & Heide, L. (2011).** Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One* **6**, e27336.
- Borthwick, A. D. (2012).** 2,5-diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chem. Rev.* **112**, 3641-3716.
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M. G. (2005).** Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* **12**, 717-739.
- Brakhage, A., Browne, P. & Turner, G. (1992).** Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J. Bacteriol.* **174**, 3789-3799.
- Brakhage, A. A. (2013).** Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 21-32.
- Bräse, S., Encinas, A., Keck, J. & Nising, C. F. (2009).** Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem. Rev.* **109**, 3903-3990.
- Brown, D. W., Yu, J.-H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. & Leonard, T. J. (1996).** Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 1418-1422.
- Bushley, K. E., Raja, R., Jaiswal, P., Cumbie, J. S. et al. (2013).** The genome of *tolypocladium inflatum*: evolution, organization, and expression of the cyclosporin biosynthetic gene cluster. *PLoS Genet.* **9**, e1003496.
- Campbell, N. A. and Reece, J. B.** Die Mechanismen der Evolution. Teil IV. Biologie 6th, 499-504. 2003.
- Chang, J. C. S., Foarde, K. K. & Vanosdell, D. W. (1995).** Growth evaluation of fungi (*Penicillium* and *Aspergillus* spp.) on ceiling tiles. *Atmos. Environ.* **29**, 2331-2337.

Chiang, Y. M., Oakley, C. E., Ahuja, M., Entwistle, R., Schultz, A., Chang, S. L., Sung, C. T., Wang, C. C. & Oakley, B. R. (2013). An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7720-7731.

Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Entwistle, R., Keller, N. P., Wang, C. C. & Oakley, B. R. (2010). Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2067-2074.

Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R. & Wang, C. C. (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2965-2970.

Chooi, Y. H., Fang, J., Liu, H., Filler, S. G., Wang, P. & Tang, Y. (2013). Genome mining of a prenylated and immunosuppressive polyketide from pathogenic Fungi. *Org. Lett.* **15**, 780-783.

Chooi, Y. H., Wang, P., Fang, J., Li, Y., Wu, K., Wang, P. & Tang, Y. (2012). Discovery and characterization of a group of fungal polycyclic polyketide prenyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9428-9437.

Conner, D. E. & Beuchat, L. R. (1987). Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. *Intern. J. Food Microbiol.* **4**, 303-312.

Coriglione, G., Stella, G., Gafa, L., Spata, G., Oliveri, S., Padhye, A. A. & Ajello, L. (1990). *Neosartorya fischeri* var *fischeri* (Wehmer) Malloch and Cain 1972 (anamorph: *Aspergillus fischerianus* Samson and Gams 1985) as a cause of mycotic keratitis. *Eur. J. Epidemiol.* **6**, 382-385.

Crosa, J. H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 530.

Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223-249.

Ding, Y., Wet, J. R., Cavalcoli, J., Li, S. et al. (2010). Genome-based characterization of two prenylation steps in the assembly of the stephacidin and notoamide anticancer agents in a marine-derived *Aspergillus* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12733-12740.

Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. (2004). Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11432-11433.

Ellestad, G. A., Mirando, P. & Kunstmann, M. P. (1973). Structure of the metabolite LL-S490B from an unidentified *Aspergillus* species. *J. Org. Chem.* **38**, 4204-4205.

Endo, A., Kuroda, M. & Tsujita, Y. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* **29**, 1346-1348.

Eppelmann, K., Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (2002). Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **41**, 9718-9726.

- Facchini, P. J. (2001).** ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**, 29-66.
- Fedorova, N. D., Khaldi, N., Joardar, V. S., Maiti, R. et al. (2008).** Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS. Genet.* **4**, e1000046.
- Fill, T. P., Asenhan, H. B., Marques, A. S., Ferreira, A. G. & Rodrigues-Fo, E. (2012).** Time course production of indole alkaloids by an endophytic strain of *Penicillium brasilianum* cultivated in rice. *Nat. Prod. Res.* **27**, 967-974.
- Fleming, A. (1929).** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226-236.
- Frèbort, I., Matsushita, K. & Adachi, O. (2008).** The fungus *Gibberella fujikuroi* produces copper/topaquinone-containing amine oxidase when induced by n-butylamine. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 11-23.
- Frisvad, J. C., Rank, C., Nielsen, K. F. & Larsen, T. O. (2009).** Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **47**, S53-S71.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O. & Samson, R. A. (2004).** Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* **49**, 201-241.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J. et al. (2005).** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115.
- Gallagher, R. T. & Latch, G. C. M. (1977).** Production of the tremorgenic mycotoxins verruculogen and fumitremorgin B by *Penicillium piscarium* Westling. *Appl. Envir. Microbiol.* **33**, 730-731.
- Gao, X., Chooi, Y. H., Ames, B. D., Wang, P., Walsh, C. T. & Tang, Y. (2011).** Fungal indole alkaloid biosynthesis: Genetic and biochemical investigation of the tryptophalanine pathway in *Penicillium aethiopicum*. *J Am. Chem Soc.* **133**, 2729-2741.
- Garcia-Estrada, C., Ullàn RV, Albillos SM, Fernàndez-Bodega MÀ, Durek P, von Döhren H & Martin JF (2011).** A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* **18**, 1499-1512.
- Ge, H. M., Yu, Z. G., Zhang, J., Wu, J. H. & Tan, R. X. (2009).** Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *J. Nat. Prod.* **72**, 753-755.
- Gehring, A. M., DeMoll, E., Fetherston, J. D., Mori, I., Mayhew, G. F., Blattner, F. R., Walsh, C. T. & Perry, R. D. (1998).** Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* **5**, 573-586.
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J. & Samson, R. A. (2007).** The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **59**, 10.

- Geltner, C., Lass-Flörl, C., Bonatti, H., Müller, L. & Stelzmüller, I. (2013).** Invasive pulmonary mycosis due to *Penicillium chrysogenum*: a new invasive pathogen. *Transplantation* **95**, e21-3.
- Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullo, S. S. & Li, S.-M. (2008).** FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *ChemBiochem* **9**, 2059-2063.
- Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 2199-2207.
- Hajjaj, H., Niederberger, P. & Duboc, P. (2001).** Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2596-2602.
- Harrison, D. M. & Quinn, P. (1983).** The biosynthesis of echinulin: origins of the diastereotopic methyls in the 1,1-dimethylallyl group. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 879-880.
- Hawksworth, D. L. (2001).** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **105**, 1422-1432.
- Healy, F. G., Wach, M., Krasnoff, S. B., Gibson, D. M. & Loria, R. (2000).** The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **38**, 794-804.
- Heide, L. (2009).** Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 171-179.
- Hochlowski, J. E., Mullally, M. M., Spanton, S. G., Whittern, D. N., Hill, P. & McAlpine, J. B. (1993).** 5-N-acetylardeemin, a novel heterocyclic compound which reverses multiple drug resistance in tumor cells. II. Isolation and elucidation of the structure of 5-N-acetylardeemin and two congeners. *J. Antibiot.* **46**, 380-386.
- Hoffmeister, D. & Keller, N. P. (2007).** Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 393-416.
- Hori, K., Yamamoto, Y., Minetoki, T., Kurotsu, T., Kanda, M., Miura, S., Okamura, K. & Furuyama, J. S. Y. (1989).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the gramicidin S synthetase 1 gene. *J. Biochem.* **106**, 639-645.
- Houbraken, J., Frisvad, J. C. & Samson, R. A. (2011).** Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* **2**, 87-95.
- Hunter, C. A. & Lea, R. G. (1995).** The airborne fungal population of representative British homes. *Qual. Monogr.* **2**, 141-153.
- Jain, H. D., Zhang, C., Zhou, S., Zhou, H. et al. (2008).** Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, a potent inhibitor of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4626-4651.
- Jakobsen, M., Cantor, M. D. and Jespersen, L.** Production of bread, cheese and meat. The Mycota X: Industrial Applications, 3-22. 2002.

- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B. et al. (2006).** Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**, 818-822.
- Jansen, N. (2012).** Isolierung und Charakterisierung von neuen Naturstoffen aus marinen Pilzen. *Dissertation Christian-Albrechts-Universität Kiel*.
- Jost, M., Zocher, G., Tarcz, S., Matuschek, M., Xie, X., Li, S.-M. & Stehle, T. (2010).** Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17849-17858.
- Kalb, D., Lackner, G. & Hoffmeister, D. (2013).** Fungal peptide synthetases: an update on functions and specificity signatures. *Fungal Biology Reviews* **27**, 43-50.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Phonkerd, N., Soyong, K., Kongsaree, P. & Suksamrarn, A. (2002).** Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* **68**, 834-836.
- Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y. et al. (2009).** Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **10**, 920-928.
- Khalidi, N., Collemare, J., Lebrun, M. H. & Wolfe, K. H. (2008).** Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genome Biol.* **9**, R18.
- Khalidi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. & Fedorova, N. D. (2010).** SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal. Genet. Biol.* **47**, 736-741.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. (2001).** Dictionary of the Fungi, 9th Edition. *Wallingford, UK: CABI Publishing*.
- Kolariková, K., Galuszka, P., Sedlářová, I., Sebela, M. & Frébort, I. (2009).** Functional expression of amine oxidase from *Aspergillus niger* (AO-I) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 13-20.
- Kozlovskii, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H. M. & Gräfe, U. (2000).** New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **63**, 698-700.
- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G. & Adanin, V. M. (2000).** Diketopiperazine alkaloids from the fungus *Penicillium piscarium* Westling. *Appl. Biochem. Microbiol.* **36**, 271-275.
- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H.-M. & Gräfe, U. (2001a).** New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **64**, 553-554.
- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H.-M. & Gräfe, U. (2001b).** New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **64**, 553-554.
- Kremer, A. & Li, S.-M. (2010).** A tyrosine O-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiology* **156**, 278-286.

- Kremer, A., Westrich, L. & Li, S.-M. (2007).** A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* **153**, 3409-3416.
- Kumano, T., Richard, S. B., Noel, J. P., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2008).** Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8117-8126.
- Kusumoto, K., Nogata, Y. & Ohta, H. (2000).** Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.* **37**, 104-111.
- Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2005).** Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983-987.
- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. A., Samson, R. A. & Frisvad, J. C. (2007).** Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section Fumigati. *Med. Mycol.* **45**, 225-232.
- Larsen, T. O., Svendsen, A. & Smedsgaard, J. (2001).** Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3630-3635.
- Lartigue, C., Glass, J. I., Alperovich, N., Pieper, R., Parmar, P. P., Hutchison, C. A., Smith, H. O. & Venter, J. C. (2007).** Genome transplantation in bacteria: Changing one species to another. *Science* **317**, 632-638.
- Latge, J.-P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310-350.
- Li, S.-M. (2010).** Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 57-78.
- Li, S.-M. (2011).** Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes. *J. Antibiot.* **64**, 45-49.
- Licorish, K., Novey, H. S., Kozak, P., Fairshter, R. D. & Wilson, A. F. (1985).** Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **76**, 819-825.
- Lo, H. C., Entwistle, R., Guo, C. J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J. H., Chiang, Y. M., Oakley, B. R. & Wang, C. C. (2012).** Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4709-4720.
- Lonial, S., Williams, L., Carrum, G., Ostrowski, M. & McCarthy, P. Jr. (1997).** *Neosartorya fischeri*: an invasive fungal pathogen in an allogeneic bone marrow transplant patient. *Bone Marrow Transplant.* **19**, 753-755.
- Lopez-Diaz, T. M. & Flannigan, B. (1997).** Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 129-136.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T. et al. (2005).** Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**, 1157-1161.

- Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. (2006).** The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem.* **7**, 1062-1069.
- Maiya, S., Grundmann, A., Li, X., Li, S.-M. & Turner, G. (2007).** Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **8**, 1736-1743.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997).** Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev.* **97**, 2651-2674.
- Marchelli, R., Dossena, A. & Casnati, G. (1975).** Biosynthesis of neoechinulin by *Aspergillus amstelodami* from cyclo-L-[U-14C]alanyl-L-[5,7-3H₂]tryptophyl. *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* 779-780.
- Martin-Tanguy, J. (2001).** Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul.* **34**, 135-148.
- Matuschek, M., Wallwey, C., Wollinsky, B., Xie, X. & Li, S.-M. (2012).** *In vitro* conversion of chanoclavine-I aldehyde to the stereoisomers festuclavine and pyroclavine controlled by the second reduction step. *RSC Advances* **2**, 3662-3669.
- Matuschek, M., Wallwey, C., Xie, X. & Li, S.-M. (2011).** New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: an agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 4328-4335.
- McGrath, A. P., Mithieux, S. M., Collyer, C. A., Bakhuis, J. G. et al. (2011).** Structure and activity of *Aspergillus nidulans* copper amine oxidase. *Biochemistry* **50**, 5718-5730.
- Melzer, M. & Heide, L. (1994).** Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 93-102.
- Metzger, U., Keller, S., Stevenson, C. E., Heide, L. & Lawson, D. M. (2010).** Structure and mechanism of the magnesium-independent aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic pathway. *J. Mol. Biol.* **404**, 611-626.
- Metzger, U., Schall, C., Zocher, G., Unsöld, I., Stec, E., Li, S.-M., Heide, L. & Stehle, T. (2009).** The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14309-14314.
- Micheli, P. A. (1729).** Nova Plantarum Genera. *Florentiae*.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1997).** The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179**, 6843-6850.
- Mundt, K. & Li S.-M. (2013).** CdpC2PT, a reverse prenyltransferase from *Neosartorya fischeri* with distinct substrate preference from known C2-prenyltransferases. *Microbiology* **159**, 2169-2179.

- Mundt, K., Wollinsky, B., Ruan, H. L., Zhu, T. & Li, S.-M. (2012).** Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches. *Chembiochem* **13**, 2583-2592.
- Nakagawa, K., Hirota, Y., Sawada, N., Yuge, N. et al. (2010).** Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L. R. & Frisvad, J. C. (1988).** Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1504-1510.
- Noike, M., Liu, C., Ono, Y., Hamano, Y., Toyomasu, T., Sassa, T., Kato, N. & Dairi, T. (2012).** An enzyme catalyzing O-prenylation of the glucose moiety of fusicoccin A, a diterpene glucoside produced by the fungus *Phomopsis amygdali*. *Chembiochem* **13**, 566-573.
- O'Brien, E. & Dietrich, D. R. (2005).** Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 33-60.
- O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T. & Frisvad, J. C. (2006).** Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9268-9276.
- Ohara, K., Yamamoto, K., Hamamoto, M., Sasaki, K. & Yazaki, K. (2006).** Functional characterization of OsPPT1, which encodes p-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* **47**, 581-590.
- Ohmomo, S., Utagawa, T. & Abe, M. (1977).** Identification of roquefortine C produced by *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2097-2098.
- Oxford, A. E., Raistrick, H. & Simonart, P. (1939).** Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochem. J.* **33**, 240-248.
- Ozaki, T., Mishima, S., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2009).** NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J. Antibiot.* **62**, 385-392.
- Ozaki, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2013).** Novel tryptophan metabolism by a potential gene cluster that is widely distributed among actinomycetes. *J. Biol. Chem.* **288**, 9946-9956.
- Pockrandt, D., Ludwig, L., Fan, A., Konig, G. M. & Li, S. M. (2012).** New insights into the biosynthesis of prenylated xanthenes: Xptb from *Aspergillus nidulans* catalyses an O-prenylation of xanthenes. *Chembiochem* **13**, 2764-2771.
- Pohlmann, V. & Marahiel, M. A. (2008).** Delta-amino group hydroxylation of L-ornithine during coelichelin biosynthesis. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 1843-1848.

- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S.-M. & Heide, L. (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2316-2321.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. & Bufton, A. W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**, 238.
- Prieto, C., Garcia-Estrada, C., Lorenzana, D. & Martin, J. F. (2012). NRPSp: non-ribosomal peptide synthase substrate predictor. *Bioinformatics.* **28**, 426-427.
- Qiao, K., Zhou, H., Xu, W., Zhang, W., Garg, N. & Tang, Y. (2011). A fungal nonribosomal peptide synthetase module that can synthesize thiopyrazines. *Org. Lett.* **13**, 1758-1761.
- Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W. & Greenberger, L. M. (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**, 47-50.
- Raju, R., Piggott, A. M., Huang, X. C. & Capon, R. J. (2011). Nocardioazines: a novel bridged diketopiperazine scaffold from a marine-derived bacterium inhibits p-glycoprotein. *Org. Lett.* **13**, 2770-2773.
- Reshetilova, T. A., Vinokurova, N. G., Khmelenina, V. N. & Kozlovskii, A. G. (1995). The role of roquefortine in the synthesis of alkaloids, meleagrine, glandicolines A and B, and oxaline in *Penicillium glandicola* and *P. atramentosum*. *Mikrobiology (Moscow)* **64**, 27-29.
- Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D. & Nasser, W. (2002). Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J. Bacteriol* **184**, 654-655.
- Rochfort, S. J., Moore, S., Craft, C., Martin, N. H., Van Wagoner, R. M. & Wright, J. L. (2009). Further studies on the chemistry of the flustra alkaloids from the bryozoan *Flustra foliacea*. *J. Nat. Prod.* **72**, 1773-1781.
- Röttig, M., Medema, M. H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. & Kohlbacher, O. (2011). NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.* **39**, W362-W367.
- Rudolf, J. D. & Poulter, C. D. (2013). Tyrosine O-Prenyltransferase SirD Catalyzes S-, C-, and N-Prenylations on Tyrosine and Tryptophan Derivatives. *ACS Chem. Biol.*
- Rudolf, J. D., Wang, H. & Poulter, C. D. (2013). Multisite prenylation of 4-substituted tryptophans by dimethylallyltryptophan synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1895-1902.
- Ruiz-Sanchis, P., Savina, S. A., Albericio, F. & Alvarez, M. (2011). Structure, bioactivity and synthesis of natural products with hexahydropyrrolo[2,3-b]indole. *Chemistry.* **17**, 1388-1408.
- Rundberget, T., Skaar, I. & Flåøyen, A. (2004). The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *Int. J. Food Microbiol.* **90**, 181-188.
- Sabater-Vilar, M., Maas, R. F., De Bosschere, H., Ducatelle, R. & Fink-Gremmels, J. (2004). Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. *Mycopathologia* **158**, 419-426.

- Sabater-Vilar, M., Nijmeijer, S. & Fink-Gremmels, J. (2003).** Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (fumitremorgen B, paxilline, penitrem A, verruculogen, and verrucosidin) produced by molds isolated from fermented meats. *J. Food Prot.* **66**, 2123-2129.
- Sallam, L. A., El-Refai, A. M., Hamdy, A. H., El-Minofi, H. A. & Abdel-Salam, I. S. (2003).** Role of some fermentation parameters on cyclosporin A production by a new isolate of *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**, 321-328.
- Samson, R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. & Varga, J. (2007).** Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud. Mycol.* **59**, 147-203.
- Samson, R. A., Varga, J., Meijer, M. & Frisvad, J. C. (2011).** New taxa in *Aspergillus* section Usti. *Stud. Mycol.* **69**, 81-97.
- Sasaki, K., Mito, K., Ohara, K., Yamamoto, H. & Yazaki, K. (2008).** Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol.* **146**, 1075-1084.
- Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yamamoto, H. & Yazaki, K. (2011).** Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*. *J. Biol. Chem.* **286**, 24125-24134.
- Scherlach, K., Schuemann, J., Dahse, H. M. & Hertweck, C. (2010).** Aspernidine A and B, prenylated isoindolinone alkaloids from the model fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Antibiot.* **63**, 375-377.
- Schilling, B. & Lerch, K. (1995).** Amine oxidases from *Aspergillus niger*: identification of a novel flavin-dependent enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1243**, 529-537.
- Schneider, P., Weber, M. & Hoffmeister, D. (2008).** The *Aspergillus nidulans* enzyme TdiB catalyzes prenyltransfer to the precursor of bioactive asterriquinones. *Fungal. Genet. Biol.* **45**, 302-309.
- Schracke, N. (2005).** Die molekulare Logik der nichtribosomalen Peptidsynthetasen: Identifizierung und biochemische Charakterisierung der Biosynthesegene für Gramicidin A. *Dissertation Philipps-Universität Marburg*.
- Schroeder, H. W., Cole, R. J., Hein, H., Jr. & Kirksey, J. W. (1975).** Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus caespitosus*. *Appl. Microbiol.* **29**, 857-858.
- Schuller, J. M., Zocher, G., Liebhold, M., Xie, X., Stahl, M., Li, S.-M. & Stehle, T. (2012).** Structure and catalytic mechanism of a cyclic dipeptide prenyltransferase with broad substrate promiscuity. *J. Mol. Biol.* **422**, 87-99.
- Schultz, A. W., Lewis, C. A., Luzung, M. R., Baran, P. S. & Moore, B. S. (2010).** Functional characterization of the cyclomarin/cyclomarine prenyltransferase CymD directs the biosynthesis of unnatural cyclic peptides. *J. Nat. Prod.* **73**, 373-377.
- Schumacher, D. (2005).** Untersuchungen zur genotoxischen und mutagenen Wirkung des Mykotoxins Patulin. *Dissertation Universität Karlsruhe*.

Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 275-287.

Segal, B. H., DeCarlo, E. S., Kwon-Chung, K. J., Malech, H. L., Gallin, J. I. & Holland, S. M. (1998). *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* **77**, 345-354.

Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Tokuoka, M., Koyama, Y., Kitamoto, K., Ebizuka, Y. & Fujii, I. (2009). Functional expression of the *Aspergillus flavus* PKS-NRPS hybrid CpaA involved in the biosynthesis of cyclopiazonic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3288-3292.

Sirisanthana, V. & Sirisanthana, T. (1995). Disseminated *Penicillium marneffei* infection in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**, 935-940.

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C. & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 141-149.

Speth, C., Rambach, G., Würzner, R. & Lass-Flörl, C. (2008). Complement and fungal pathogens: an update. *Mycoses* **51**, 477-496.

Stachelhaus, T., Huser, A. & Marahiel, M. A. (1996). Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* **3**, 913-921.

Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (1995). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3-14.

Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493-505.

Starkov, A. A. & Fiskum G. (2001). Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 645-650.

Stec, E., Pistorius, D., Müller, R. & Li, S.-M. (2011). AuaA, a membrane-bound farnesyltransferase from *Stigmatella aurantiaca*, catalyzes the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline in the biosynthesis of aurachins. *Chembiochem* **12**, 1724-1730.

Steffan, N. (2009). Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese von Mykotoxinen aus Ascomyceten. *Dissertation Philipps-Universität Marburg*.

Steffan, N., Grundmann, A., Afiyatullo, A., Ruan, H. & Li, S.-M. (2009). FtmOx1, a non heme Fe(II) and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4082-4087.

Steiger, M. G., Blumhoff, M. L., Mattanovich, D. & Sauer, M. (2013). Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front. Microbiol.* **4**:23, 1-5.

Steinchen, W., Lackner, G., Yasmin, S., Schrettl, M., Dahse, H. M., Haas, H. & Hoffmeister, D. (2013). Bimodular Peptide Synthetase SidE Produces Fumarylalanine in the Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6670-6676.

- Stipanovic, R. D. & Schroeder, H. W. (1976).** Preechinulin, a metabolite of *Aspergillus chevalieri*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**, Pt. 1, 178-179.
- Stocking, E. M., Williams, R. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000).** Reverse prenyl transferases exhibit poor facial discrimination in the biosynthesis of paraherquamide A, brevianamide A, and austamide. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9089-9098.
- Stoev, S. D. (1998).** The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation. *Vet. Hum. Toxicol.* **40**, 352-360.
- Strieker, M., Tanovic, A. & Marahiel, M. A. (2010).** Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 234-240.
- Subramanian, S., Shen, X., Yuan, Q. & Yan, Y. (2012).** Identification and biochemical characterization of a 5-dimethylallyltryptophan synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Process Biochem.* **47**, 1419-1422.
- Summerbell, R. C., de Repentigny, L., Chartrans, C. & St.Germain, G. (1992).** Graft-related endocarditis caused by *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*. *J Clin Microbiol.* **6**, 1580-1582.
- Szewczyk, E., Chiang, Y. M., Oakley, C. E., Davidson, A. D., Wang, C. C. & Oakley, B. R. (2008).** Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7607-7612.
- Takahashi, S., Takagi, H., Toyoda, A., Uramoto, M., Nogawa, T., Ueki, M., Sakaki, Y. & Osada, H. (2010).** Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J. Bacteriol.* **192**, 2839-2851.
- Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2008).** The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 1459-1463.
- Toyota, M. & Ihara, M. (1998).** Recent progress in the chemistry of non-monoterpenoid indole alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **15**, 327-340.
- Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L. (1995).** The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 119-125.
- Tsunematsu, Y., Ishikawa, N., Wakana, D., Goda, Y., Noguchi, H., Moriya, H., Hotta, K. & Watanabe, K. (2013).** Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **chembio.1366**.
- Turgay, K., Krause, M. & Marahiel, M. A. (1992).** Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**, 529-546.
- Udagawa, T., Yuan, J., Panigrahy, D., Chang, Y. H., Shah, J. & D'Amato, R. J. (2000).** Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 421-427.

- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2005). Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 1499-1505.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2006). Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* **7**, 158-164.
- Usui, T., Kondoh, M., Cui, C. B., Mayumi, T. & Osada, H. (1998). Tryprostatin A, a specific and novel inhibitor of microtubule assembly. *Biochem. J.* **333**, 543-548.
- van den Berg, M. A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J. H. et al. (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1161-1168.
- van Wageningen, A. M., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., Jones, M., Jones, S. J. & Solenberg, P. J. (1998). Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* **5**, 155-162.
- Varga, J. and Samson, R. A. *Aspergillus* in the Genomic Era. 2008. Wageningen Academic Publishers.
- von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R. (1997). Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem. Rev.* **97**, 2675-2705.
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Nozawa, K., Okada, K., Takaki, G. M. d. C., Yaguchi, T., Fukushima, K. & Kawai, K. I. (2006). Isolation of isoterrein from *Neosartorya fischeri*. *Mycotoxins* **56**, 3-6.
- Wallwey, C. & Li, S.-M. (2011). Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 496-510.
- Wang, H. J., Gloer, J. B., Wicklow, D. T. & Dowd, P. F. (1995). Aflavinines and other antiinsectan metabolites from the ascostromata of *Eupenicillium crustaceum* and related species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4429-4435.
- Wang, M., Feng, X., Cai, L., Xu, Z. & Ye, T. (2012a). Total synthesis and absolute configuration of nocardioazine B. *Chem. Commun. (Camb)* **48**, 4344-4346.
- Wang, W. L., Lu, Z. Y., Tao, H. W., Zhu, T. J., Fang, Y. C., Gu, Q. Q. & Zhu, W. M. (2007a). Isoechinulin-type alkaloids, variecolorins A-L, from halotolerant *Aspergillus varicolor*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1558-1564.
- Wang, W. L., Zhu, T. J., Tao, H. W., Lu, Z. Y., Fang, Y. C., Gu, Q. Q. & Zhu, W. M. (2007b). Three novel, structurally unique spirocyclic alkaloids from the halotolerant B-17 fungal strain of *Aspergillus varicolor*. *Chem. Biodivers.* **4**, 2913-2919.
- Wang, Y., Li, Z. L., Bai, J., Zhang, L. M., Wu, X., Zhang, L., Pei, Y. H., Jing, Y. K. & Hua, H. M. (2012b). 2,5-diketopiperazines from the marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* YK-7. *Chem. Biodivers.* **9**, 385-393.

- Watson, A. J., Fuller, L. J., Jeenes, D. J. & Archer, D. B. (1999).** Homologs of aflatoxin biosynthesis genes and sequence of aflR in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 307-310.
- Weber, G., Schultz, A., Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. & Leitner, E. (1994).** The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.* **26**, 120-125.
- Weber, S. S., Bovenberg, R. A. & Driessen, A. J. (2012).** Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. J.* **7**, 225-236.
- Webster, J. and Weber, R. W. S.** Introduction to Fungi. s Third Edition. 2007. Cambridge University Pres.
- Wiemann, P., Guo C.J., Palmer, L. M., Sekonyela, R., Wang, C. C. & Keller, N. P. (2013).** Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17065-17070.
- Williams, R. M., Stocking, E. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000).** Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr. Chem.* **209**, 97-173.
- Willingale, J., Perera, K. P. & Mantle, P. G. (1983).** An intermediary role for the tremorgenic mycotoxin TR-2 in the biosynthesis of verruculogen. *Biochem. J.* **214**, 991-993.
- Wollinsky, B., Ludwig, L., Xie, X. & Li, S.-M. (2012).** Breaking the regioselectivity of indole prenyltransferases: identification of regular C3-prenylated hexahydropyrrolo[2,3-b]indoles as side products of the regular C2-prenyltransferase FtmPT1. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 9262-9270.
- Wortman, J. R., Gilsenan, J. M., Joardar, V., Deegan, J. et al. (2009).** The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal. Genet. Biol.* **46**, S2-S13.
- Xu, Z., van den Berg, M. A., Scheuring, C., Covaleta, L. et al. (2005).** Genome physical mapping from large-insert clones by fingerprint analysis with capillary electrophoresis: a robust physical map of *Penicillium chrysogenum*. *Nucleic Acids Res.* **33**.
- Yamada, H., Adachi, O. & Ogata, K. (1965).** Amine oxidases of microorganisms
Part I. Formation of Amine Oxidase by Fungi. *Agric. Biol. Chem.* **29**, 123.
- Yamazaki, M., Fujimoto, H. & Kawasaki, T. (1980).** Chemistry of tremorogenic metabolites. I. Fumitremorgin A from *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 245-254.
- Yamazaki, M., Okuyama, E. & Maebayashi, Y. (1979).** Isolation of some new tryptoquivaline-related metabolites from *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 1611-1617.
- Yazaki, K., Kuniyama, M., Fujisaki, T. & Sato, F. (2002).** Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 6240-6246.
- Yin, S., Yu, X., Wang, Q., Liu, X. Q. & Li, S.-M. (2013).** Identification of a brevianamide F reverse prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* with a broad substrate specificity towards tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1649-1660.

- Yin, W. B. & Keller, N. P. (2011).** Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J. Microbiol.* **49**, 329-339.
- Yin, W.-B., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009a).** Stereospecific synthesis of aszonalenins by using two recombinant prenyltransferases. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2202-2207.
- Yin, W.-B., Grundmann, A., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009b).** Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J. Biol. Chem.* **284**, 100-109.
- Yin, W.-B., Ruan, H.-L., Westrich, L., Grundmann, A. & Li, S.-M. (2007).** CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterisation. *Chembiochem* **8**, 1154-1161.
- Yin, W.-B., Yu, X., Xie, X.-L. & Li, S.-M. (2010).** Preparation of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying a β -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using a recombinant prenyltransferase CdpC3PT. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 2430-2438.
- Yu, X. (2013).** Molecular biological and biochemical investigations on the biosynthetic enzymes of prenylated indole alkaloids from fungi. *Dissertation Philipps-Universität Marburg*.
- Yu, X. & Li, S.-M. (2012).** Prenyltransferases of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily. *Methods Enzymol.* **516**, 259-278.
- Yu, X., Liu, Y., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2012).** Biochemical characterization of indole prenyltransferases: Filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 1371-1380.
- Yu, X., Xie, X. & Li, S.-M. (2011).** Substrate promiscuity of secondary metabolite enzymes: prenylation of hydroxynaphthalenes by fungal indole prenyltransferases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 737-748.
- Yu, X., Zocher, G., Xie, X., Liebhold, M., Schütz, S., Stehle, T. & Li, S.-M. (2013).** Catalytic Mechanism of Stereospecific Formation of cis-Configured Prenylated Pyrroloindoline Diketopiperazines by Indole Prenyltransferases. *Chemistry & Biology* doi: org/10.1016/j.chembiol.2013.10.007.
- Zelenkova, N. F., Vinokurova, N. G. & Arinbasarov, M. U. (2003).** Analysis of secondary metabolites of microscopic fungi of the genus *Penicillium* by chromatographic techniques. *Appl. Biochem. Microbiol.* **39**, 44-54.
- Zhang, H. W., Zhang, J., Hu, S., Zhang, Z. J., Zhu, C. J., Ng, S. W. & Tan, R. X. (2010).** Ardeemins and cytochalasins from *Aspergillus terreus* residing in *Artemisia annua*. *Planta Med.* **76**, 1616-1621.
- Zocher, R., Keller, U. & Kleinauf, H. (1982).** Enniatin synthetase, a novel type of multifunctional enzyme catalyzing depsipeptide synthesis in *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry* **21**, 43-48.
- Zou, H.-X., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2011).** The tyrosine O-prenyltransferase SirD catalyzes O-, N-, and C-prenylations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1443-1451.

Zou, H.-X., Xie, X.-L., Linne, U., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2010). Simultaneous C7- and N1-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3037-3044.

7. Anhang

7.1 Muti-Proteinsequenzvergleiche ausgewählter Prenyltransferasen zur Unterstützung der Intron-Exon Vorhersage

7.1.1 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit FtmPT3

```

EAW19377_2 -----MTIHFQNHDLPTGSAMK-----ATPFEALDLVFHFED--QAQRQWKKQAGPVLGQHLLLN-YDINKQYQYLCCF
EAW19377_1 -----MTIHFQNHDLPTGSAMK-----ATPFEALDLVFHFED--QAQRQWKKQAGPVLGQHLLLN-YDINKQYQYLCCF
SirD -----MQTARLFQCNINLAAANIRDYKKEQRN-----LGVWLSLNQNLRLYD--EDTRFWMTTAPMLGRMELIG-YDQDAQKHLFF
7-DMATS MSTGAEISDLSVPPGNGTAAGYPAKTQKELNSGDFDAHDGSLAQITPYDVLTALPLPAPASSTGFWRRTGPMVKSLAKAN-YPLIYTHYKYLMLY
FgaPT2 -----MKA-NASSA-----EAYRVLSDVFEFSN--DDQLWVHSTAPMFAMQLSAN-YDAHAQYRHLATY
MaPT -----MSTTES-TASHQ-----AVYKTLSDVFEFSN--DDQLWVHSTAPMFAMQLSAN-YDAHAQYRHLATY
DMATS-Cp -----MSTAKDFGN-----GVYELLSLDFEFS--NEQLWVHSTAPMFAMQLSAN-YDAHAQYRHLATY
DMATS-Cs -----MAT-NESGR-----GVYELLSLDFEFS--DEQLWVHSTAPMFAMQLSAN-YDAHAQYRHLATY
FtmPT2 -----MTTPEISCEE-----DAFQLDKSWFSS--DDQRWVHSTAPMFAMQLSAN-YDAHAQYRHLATY
FtmPT1 -----MPPAPPDQKPHQLQ-----APYRALSLSLGS--VDEERWVHSTAPMFAMQLSAN-YDAHAQYRHLATY
AnaPT -----MSPLSQMSTDSQ-TAENKSLTNGTNSND-----QKPMKVLKSGELPT--IEQEQYHNTAPYNNILQCG-YDHAQYQYLAFY
CdpNPT -----WDGEMTASPPDISA-DTSAVDQTCQSGSQAP-----IPKDIAYHTLTKALLFD--IDQYQHWHHVAFPMKAVDVK-YSIHOQYELCLF
FgaPT1 -----MKTKDAQRHPEQATAHAATDEEVQDQWR-----APFEVLSRLTVFQH--EDHRLWERAASKIATYRLK-YSVGSQYQHLMF
TdiB -----MATEYWRHLRSVLAPLFAAGTYSFEDQSHLAF-----

```

```

EAW19377_2 GHHIIPILGPGPGSCYD-----YHPLEISQNFQ--RSGSTIRLGFQPRAYSSCVSFQDPFGLSTEEAMARLGQVTVGVLDLQPYHL
EAW19377_1 GHHIIPILGPGPGSCYD-----YHPLEISQNFQ--RSGSTIRLGFQPRAYSSCVSFQDPFGLSTEEAMARLGQVTVGVLDLQPYHL
SirD YIYVLPISLGRPSPECYPTG-----WNSFMTDDYSPLSLSDWDC-VAECESSVRFSEIPICKYACTQ-ADPLNQKMYQVLDGLRPAFHHLDLTLEFV
7-DMATS HTHILPLLGRRPPELNSSTHPSPSNAPWRSFLTDDFTPLEPSWNVNNGSEAQTIRLGIPIGFEAGAA-ADPPNQAAVTPQMHSY-EATEVGATLTLEFH
FgaPT2 KECVPLSLGCTPTNSAP-----RWLSILTRYCTPPELSLNCN-----NSIVRYTFEPINQHTGTD-KDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN
MaPT KKHVLPFGLGYPTKDKC-----RWLSILTRYCTPPELSLNCN-----DSVVRYTFEPINQHTGTD-KDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN
DMATS-Cp KKHVLPFGLGYPTKDKC-----RWLSILTRYCTPPELSLNCN-----DSVVRYTFEPINQHTGTD-KDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN
DMATS-Cs KKHVLPFGLGYPTKDKC-----RWLSILTRYCTPPELSLNCN-----DSVVRYTFEPINQHTGTD-KDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN
FtmPT2 QQLDVEPLCYTVVQAP-----LFWNSNVTYCTVPELSLNLN-----HNIVRIQFPELSEHAESE-VDAFNKTAPEECVSR-AALDWTDLARFH
FtmPT1 RHVLPALGPGYQDRPETGLIA--TQSRSGVLTCLPPELSNVA-----RALIRIGDVPDADSTGA-QDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN
AnaPT RHVLPALGPGYQDRPETGLIA--TQSRSGVLTCLPPELSNVA-----RALIRIGDVPDADSTGA-QDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN
CdpNPT ARHVLPLVGPPTRSSAAN-----YISGFSAEQYPMELSVNYQAS--KATVRLGCEPVGCTAGTS-QDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN
FgaPT1 AQHVLAPVLGPGYSPGRD-----VYRCTLGCMVTELSVNFQ--RSGSTIRLGFQPRAYSSCVSFQDPFGLSTEEAMARLGQVTVGVLDLQPYHL
TdiB YSYVAPNIGPWPNDKRON-----VHVCGICPGGENTLEISNMQG--AKCTVRIAEETITPAAGTD-KDPFNTHAIWESIQRL-KAVQPAISDYFVN

```

```

EAW19377_2 LASHNLTKKEKEML-QPTCYNSLSFSEFKTQGLLAVELPTGSI-TLKGWFLSAKSMVTKTPISELSQAFFNIDHCKDLVPAIRPIEYFAEMKMKP
EAW19377_1 LASHNLTKKEKEML-QPTCYNSLSFSEFKTQGLLAVELPTGSI-TLKGWFLSAKSMVTKTPISELSQAFFNIDHCKDLVPAIRPIEYFAEMKMKP
SirD FSEALTTSR--EKFGT-RKLS--LEG--RSQYFVAFDLD-VGHRPKAYFMPGLKSIENSTPVSELVVKAMDA-ELHF-SLFGQAFRRINDLEAFS-
7-DMATS FRNDLVFVGP--ETYAA-LRAK--LPEGEHTTQSFALFDLD-ACR-TTKAYFFPIIMSLTKQSTTKVSDSLHAIKSEVWVGQTTAAMS-VMEAWI--
FgaPT2 FKHDLTINSESAFIA-HNDR--LVGCTIRTONKALDLK-DGE-MVKAYIYPALKAVTCKT-HELVEGSRVRAVREPLPMLNMLEEYIRSR--
MaPT FKHDLTINSESAFIA-HNDR--LVGCTIRTONKALDLK-DGE-MVKAYIYPALKAVTCKT-HELVEGSRVRAVREPLPMLNMLEEYIRSR--
DMATS-Cp FKHDLTINSESAFIA-HNDR--LVGCTIRTONKALDLK-DGE-MVKAYIYPALKAVTCKT-HELVEGSRVRAVREPLPMLNMLEEYIRSR--
DMATS-Cs FKHDLTINSESAFIA-HNDR--LVGCTIRTONKALDLK-DGE-MVKAYIYPALKAVTCKT-HELVEGSRVRAVREPLPMLNMLEEYIRSR--
FtmPT2 FQHHLVTPPEETWILL-KEKA--PLAKSRGQQTAVBFQ--NGGSAKAYFFPGMKSLATGLSPKMLILDSIERALPG--LKEPVGQVLDLQPYHL
FtmPT1 FQHHLVTPPEETWILL-KEKA--PLAKSRGQQTAVBFQ--NGGSAKAYFFPGMKSLATGLSPKMLILDSIERALPG--LKEPVGQVLDLQPYHL
AnaPT FQHHLVTPPEETWILL-KEKA--PLAKSRGQQTAVBFQ--NGGSAKAYFFPGMKSLATGLSPKMLILDSIERALPG--LKEPVGQVLDLQPYHL
CdpNPT FQHHLVTPPEETWILL-KEKA--PLAKSRGQQTAVBFQ--NGGSAKAYFFPGMKSLATGLSPKMLILDSIERALPG--LKEPVGQVLDLQPYHL
FgaPT1 FQHHLVTPPEETWILL-KEKA--PLAKSRGQQTAVBFQ--NGGSAKAYFFPGMKSLATGLSPKMLILDSIERALPG--LKEPVGQVLDLQPYHL
TdiB FQHHLVTPPEETWILL-KEKA--PLAKSRGQQTAVBFQ--NGGSAKAYFFPGMKSLATGLSPKMLILDSIERALPG--LKEPVGQVLDLQPYHL

```

```

EAW19377_2 -----ANPTTEQTTEFATVACDHVDMSRTRFKLYLYECLWKYDRILADIYTLGGRLKNAFGIAEGLELLREIWSILQIPEGYHFA-SLQNSL
EAW19377_1 -----ANPTTEQTTEFATVACDHVDMSRTRFKLYLYECLWKYDRILADIYTLGGRLKNAFGIAEGLELLREIWSILQIPEGYHFA-SLQNSL
SirD -----ATSYHRPELEIVGIDCVSVKSRKLYIRHRGTSFDSVCRMLSMG-AKAPLD--AASVASRLVAILGLPQPSDQELS-
7-DMATS -----GSYGGA-KTEMSVDCVNEADSRKIKYIRMPHTSLRKVKEAYCLG-CRLTENTKEGKLKLDLWLTQVFGID--EDAEALD-
FgaPT2 -----GKSTASRLVSCDLTSFAKSRKIKYILQMSVLEAMEDLWTLGGRR--DASTLEGLSLVRELWDLQISPGLSKSPYAPYLP
MaPT -----GPESTACRLLSCDLTSFAKSRKIKYILQMSVLEAMEDLWTLGGRR--DASTLEGLSLVRELWDLQISPGLSKSPYAPYLP
DMATS-Cp -----SAEVD-QHCAHARLLSCDLTPAKSRKIKYILQMSVLEAMEDLWTLGGRR--DASTLEGLSLVRELWDLQISPGLSKSPYAPYLP
DMATS-Cs -----SAETGGEYSALQRLVSCDLTPAKSRKIKYILQMSVLEAMEDLWTLGGRR--DASTLEGLSLVRELWDLQISPGLSKSPYAPYLP
FtmPT2 -----DGHTDTAIAFPLLGVDLCTPERSRLKPYITDQVSVSDRWADMTLRLGRLEDFQCADGAILRLKLDLIAFRLKPYIFDIA
AnaPT HVPGVYADKPPATAADKAFDACS-FPHFLSDTLVEPGSRVKYFASERHVNQMVEDIWTGGGLRR-DEDAIRGLELLRLHWDQVREGYTMRFGE
CdpNPT -----KPTVTSDFILAVDCTVPEKSRKIKYIADSLQSLATREFWTLGGSVT-DSATMKGLEIAELRLQLQYDAVSHSNMDQL
FgaPT1 -----QSKDDAFICDLDVDAHREKYYADSLQSLATREFWTLGGSVT-DSATMKGLEIAELRLQLQYDAVSHSNMDQL
TdiB -----RMEYDGLSYDAVDICARIKYITCIRKSEHAROVWTLGGGLQ-EDLEKQDIAVARLRRMDEEPCCEMKY--

```

```

EAW19377_2 -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
EAW19377_1 -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
SirD -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
7-DMATS -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
FgaPT2 -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
MaPT -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
DMATS-Cp -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
DMATS-Cs -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
FtmPT2 -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
FtmPT1 -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
AnaPT -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
CdpNPT -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
FgaPT1 -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD
TdiB -----DAMLVLVGLDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSAVRVOLVTLGGRLS-DDTSIKRVETLKSVWELLINELGEPQSDAATMD

```

Abb.7-1: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 12 ausgewählten Prenyltransferasen mit den vorhergesagten Sequenzen von FtmPT3 zur Exonvorhersage. Abkürzungen: EAW19377_1, vorhergesagte Proteinsequenz bestehend aus 1 Exon; EAW19377_2, vorhergesagte Proteinsequenz bestehend aus 2 Exons. FgaPT1 (Accession Nr.: XP_756136), FgaPT2 (AA08549), 7-DMATS (ABS89001), FtmPT1 (AA056314), FtmPT2 (EU622826) und CdpNPT (ABR14712) sind aus *A. fumigatus*; AnaPT (EAW16181) ist aus *N. fischeri*; DMATS-Cs (AAZ29613.1) ist aus lasaF13, DMATS-Cp (Q6X2E0) aus *C. purpurea*, TdiB (ABU51603) aus *A. nidulans*, MaPT (EU4200091) ist aus *Malbranchea aurantiaca* (*M. aurantiaca*) und SirD (AAS92554) aus *L. maculans*.


```

EAW19377_2 LQHVLSEFSYRKTGPYTTVYYWKICA-----
EAW19377_1 -----
SirD LHTYISCTEKKT-GLSVTSYFNEEIYHFNRYRQ-----
7-DMATS THTYLSFSYKKQKGVYMTMYINLRVYST-----
FgaPT2 LHAYISFSYRRN-TPYLSVYLQSDETCDWAVANLSESKVKCQDAACQPTALPPDLSTGVVYYSGLH-----
MaPT VHAYISFSYRKN-KPYLSVYLQSDETCSWSTCELS-----YIRSF-----
DMATS-Cp LHAYISFSYRRN-KPYLSVYLHTEFCRWPFADSP-----ISFDAYRRCCELSK-----
DMATS-Cs LHTYISFSYRSN-KPYLSVYLHTEFCRWPFADSP-----TAFDAYRRCDEMASKKINLADY
FtmPT2 LHSGVSEFSYRHS-KPYLSVYYSPP-----
FtmPT1 LCAYVSEFAYKNG-GAYVTLYNHSFNEVGDVSFPN-----
AnaPT VQRWVAFSYTESGGAYLTLYFHAVGGMKGNL-----
CdpNPT YQANLSFAYTKEKGPYLSIYYFWPE-----
FgaPT1 AFSYISVTFHSIKGPYITTYGNFSGPRPVF-----
TdiB GQTYASFYSYTEGKGVYTTSYVAMPIKDEGGGSLACDFGFRN-----

```

Fortsetzung Abb.7-1

7.1.2 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit CdpC2PT

SirD	-----MQTARLFGQNLNLAANIRDEYKEKQRN-----LGWVLSNQWLRLYD--EDTRFWTTTAPMLGRMMELTG-YDQDAQQHLLFY
7-DMATS	MSIGAEIDSLVPAFPGLNGLAGYPAKTQKELNSGDFDAHGLSLAQITPVDVLTALPLPAPASSTQFWRETGPVMSKLAKAN-YPLYTHYKYLMLY
FgaPT2	-----MKAANASS-----AEAYRVLSRAFRFDN--EDQKLMHSTAMPFAMKLETAN-YTPPCQVQYLITY
MaPT	-----MSTTESLTASH-----QAVYKTLSDVFEFSN--DDQKLMHSTAMPFAMKLETAN-YDAAHQYRHLAIY
DMATS-Cp	-----MSTAKDPG-----NGVYEILSLIFDEFS--NEQRLMHSTAMPFAMKLETAN-YNHQDQYRHLGIF
DMATS-Cs	-----MATVNESC-----RGVYDTLSLIFDEFD--DEQRLMHSTAMPFAMKLETAN-HNVHDQYRHLGIY
FtmPT2	-----MTIPTETISCPE-----EDATQLLDKSWFES--DDQRRWEYTGYPYLLKLIRDAK-YFQKQDQVPCILYL
FtmPT1	-----MPPAPPDQKFCCHQLQ-----PAPYRAISESILFES--VDEERWHSAPILSRLLISSN-YDVQVQYKYLILY
EAW25546_NCBI	-----MAINSRCLACKRHSESGEAEYTNRVLT-----LSPIEALARYWTSPT--EHHTQNDNDAPILSRLLIEAQ-YDVHDQVQYLLFM
EAW25546_FGENESH	-----MWTSVQKTQVLT-----LSPIEALARYWTSPT--EHHTQNDNDAPILSRLLIEAQ-YDVHDQVQYLLFM
AnaPT	-----MSPLSMQTDVSQTAENKSLTETNSND-----QQLPKVKLGKSLGLPT--IEQEQYLNTPAYFNLLIQG-YDVHQVQYLLAFY
CdpNPT	-----IDGEMTASPPDISACDTSAVDEQTSQSGSQAP-----IPKDIAYHTLTALFFD--IDQYQHWHVAPMLAKMIDCK-YSHQYQYVLCIF
FgaPT1	-----MTKTDQQRHPQETAATHAATDEEVQDQ-----WRAPFEVLSRTLVFQH--EDHRLMWERASKIATYLRDAK-YSVGSQYQHLLMF
TdiB	-----MATEYNSRHLRSVLAFLFAAGTYSFEDQESHIAFT-----
* * *	
SirD	YIIVLPSLGRRPSPEGYPTG-----WNSFTDDYSPLSNDWG-VAGESSVRFSTIEPIGKYAGTQADPLNQKMYQLVDGLRPAFHHTLDTLTFDVF
7-DMATS	HTHILPLGLRPPLPLENSHTSPSNAPWRSFLTDDFTPLEPSWNVNONSEAQSTIRLGIEPIGFEAGAAADPFNQAAVTFMHSY-EATVEGATLTLEHFT
FgaPT2	KECVIPSLGCPYTNAP-----RWLSILTRYCTPFEELSINCNS-----IVRYTFEPINQHTGTDKDPENTHAIWISLQHLLPL-EKSIDLEWHHF
MaPT	KKHVIPIFLGVVPTNDRD-----RWLSILTRYCTPFEELSINCNS-----VVRVTFEPINATGTEDAPENTHAIWISLQKAY-QA-SIDYINHF
DMATS-Cp	KKHIIPIFLGVVPTKDKK-----RWLSILTRYCTPFEELSINCNS-----VVRVTFEPINATGTEDAPENTHAIWISLQKAY-QA-SIDYINHF
DMATS-Cs	KKNIPIFLGVVPTKDKK-----RWLSILTRYCTPFEELSINCNS-----VVRVTFEPINATGTEDAPENTHAIWISLQKAY-QA-SIDYINHF
FtmPT2	QQLLVFYLGTFVVGQAP-----LPMWNVITTYGVFELSWNLHNN-----IVRIGFEPLSHAESGVDAFNKTAEECVSRKLACI-DNTIDILAR-RHF
FtmPT1	RHVLVLPALGPPYQORDPETGILIA-TQMRSGMVLTCPIEFESNNVARA-----LIRIGVDPVPTADSGTAQDPENTTRFVYVLETAAR-LPGVDLTRIEYF
EAW25546_NCBI	FGHIIPIFLGVVPTKDKK-----RWLSILTRYCTPFEELSINCNS-----VVRVTFEPINATGTEDAPENTHAIWISLQKAY-QA-SIDYINHF
EAW25546_FGENESH	FGHIIPIFLGVVPTKDKK-----RWLSILTRYCTPFEELSINCNS-----VVRVTFEPINATGTEDAPENTHAIWISLQKAY-QA-SIDYINHF
AnaPT	QQLLVFYLGTFVVGQAP-----LPMWNVITTYGVFELSWNLHNN-----IVRIGFEPLSHAESGVDAFNKTAEECVSRKLACI-DNTIDILAR-RHF
CdpNPT	AQVLVPIFLGVVPTKDKK-----RWLSILTRYCTPFEELSINCNS-----VVRVTFEPINATGTEDAPENTHAIWISLQKAY-QA-SIDYINHF
FgaPT1	YSYVAFNLGPPWPKRDN-----VHMVCGICPGGLENISMNYYQGG--AKCTVRIAAETITPAAGTDKDPENTHAIWISLQKAY-QA-SIDYINHF
TdiB	DEHIAENLGLPLWEPHG-----PYSTPSSLVGSPFDPISINIVSSG--KAKVRDFDVTISPDRTGDPDPFAGSAREILHRLADL--VGADTQWGMGYL
* * *	
SirD	SEALTTTSREK---FCGRKIS---LEG---RSQYFVAFDLD-VGHFRLKAYFMPEGLKSIESNTFVSELVVKAMDACELHFCSLFMOAFRLNSDLEAFSA--
7-DMATS	RNDMFVGPET---YAAALRAK---IPEGEHTTQSFIAFDLD-AGRVTTKAYFFPIIMSLKTCQSTTKVVSLSLHIALKSEVWGVTQIAAMS--MEAWITG--
FgaPT2	KHOLTIINSEESAFIAHNDR---LVGGTIRTONKIALDLK-DGRALKTYIYPAKAAVVTGKTHLHVFGSVRR-AVREPRILPPLNMLEEYIRSR-----
MaPT	KROLTIINSEESAFIAHNDR---LVGGTIRTONKIALDLK-DGRALKTYIYPAKAAVVTGKTHLHVFGSVRR-AVREPRILPPLNMLEEYIRSR-----
DMATS-Cp	KDELTIINSEESAFIAHNDR---LVGGTIRTONKIALDLK-DGRALKTYIYPAKAAVVTGKTHLHVFGSVRR-AVREPRILPPLNMLEEYIRSR-----
DMATS-Cs	KHLETIINSEESAFIAHNDR---LVGGTIRTONKIALDLK-DGRALKTYIYPAKAAVVTGKTHLHVFGSVRR-AVREPRILPPLNMLEEYIRSR-----
FtmPT2	QHHLVITPEEETWILKEKA---PLAKSGRGQQTIAVEYQ-NGGTSKAYFFPMKSLATGLSPGKLILDSIERALPGL--KEPEVHLRSTLGLQD--
FtmPT1	ETELVITKAEAVIQAND---LFRSPWKSQILFAMDLQKSGT-VLKAYFYYPQPKSAVTCRSTEDLLVNAIRK-DREG-RFETQANLQRYERRRGLH
EAW25546_NCBI	INAFPPSANEIRDQASGYG---KRGGEQKSPSAGFDL-KAGGCTVKGCHLLKHLATGTPVSDIVREPLVR-CRQMT--CSAFAFDMHDIYTKS-----
EAW25546_FGENESH	INAFPPSANEIRDQASGYG---KRGGEQKSPSAGFDL-KAGGCTVKGCHLLKHLATGTPVSDIVREPLVR-CRQMT--CSAFAFDMHDIYTKS-----
AnaPT	DSQSIITTSSEANLAASKLI---KORQSKVIAFDL-KDGIIPKAYFFLKGKSLASGIPVQDVAFNAIESAPKQ--IESPLRVLTFTYKTLFS--
CdpNPT	SEHLTIINSEESAFIAHNDR---LVGGTIRTONKIALDLK-DGRALKTYIYPAKAAVVTGKTHLHVFGSVRR-AVREPRILPPLNMLEEYIRSR-----
FgaPT1	QRVVLVPEEVALNDEIIS---KVPFKNORLHGLDLS-EGAMKSYFMPAARSATITGVENTQIMFESIRKLNKNANFISALSLEDMWVPTN--
TdiB	MDALYLTFAAEVAKTKLPP---GVAIPSSVGFDFD-GPERTLKFYIPSVRKALATGQDVSELMKLTIRGLQPLGSELVPMADLIASYLSTRTN---
* * *	
SirD	-----TSYHRPEIEIVGIDCVSPVKSRAKIYIRHRTSFDSCVCRMLSMG-AKAPLD--AASASLRELWALVGL-----LPKDFFS
7-DMATS	-----SYGGAATEMISVDCVNEADSRKIYIRHRTSFDSCVCRMLSMG-AKAPLD--AASASLRELWALVGL-----LPKDFFS
FgaPT2	-----GSKSTSPRLVSCDLTSPAKSRKIYILEQMVSI-EAMEDLWTLGGRRR-DASTLEGLSLVRELWDLQLSP-GLKSYPAF-----
MaPT	-----GPESTACPRLLSCDLTSSHKSRKIYILEQMVSI-EAMEDLWTLGGRRR-DASTLEGLSLVRELWDLQLSP-GLKSYPAF-----
DMATS-Cp	-----SAEVD-QHGAHARLLSCDLTSPAKSRKIYILEQMVSI-EAMEDLWTLGGRRR-DASTLEGLSLVRELWDLQLSP-GLKSYPAF-----
DMATS-Cs	-----SAETGGEYSALQPRLLSCDLTSPAKSRKIYILEQMVSI-EAMEDLWTLGGRRR-DASTLEGLSLVRELWDLQLSP-GLKSYPAF-----
FtmPT2	-----DCHPTDTA-APFLLGVDLTSPAKSRKIYILEQMVSI-EAMEDLWTLGGRRR-DASTLEGLSLVRELWDLQLSP-GLKSYPAF-----
FtmPT1	VPQVTAADKPPATAADKAFDACSFPFHLSTDLVPEPKSRKVFYASERHNM-QMVEDIWTFGGLRR-DPDALRGLELLRHADQRE-GYTYMTRPG--
EAW25546_NCBI	-----SGYKHTFLSWDYVEKEKSRKLVYSGSTSIEKAEVWVSLGGRVQ-GEEISEGLKLKLOKLTGLKS-CTNTAQPVQL
EAW25546_FGENESH	-----SGYKHTFLSWDYVEKEKSRKLVYSGSTSIEKAEVWVSLGGRVQ-GEEISEGLKLKLOKLTGLKS-CTNTAQPVQL
AnaPT	-----KPTVTSDFVILAVDCLVPEPKSRKIYILEQMVSI-EAMEDLWTLGGRRR-DASTLEGLSLVRELWDLQLSP-GLKSYPAF-----
CdpNPT	-----QSKIDDAFLCDDLVDPAHTRFKVYIADPLVTIARAEHWTGLGRLT-DEDAVVGLEIIRGLWSELGILQ-GLPEPSAM--
FgaPT1	-----RFMEYWDGISYDAVDAKARIKIYTGIRMKSEIARDVWTLGGRRLQ-GEDIEKGFDLVARLWRR-MDEE-PTSCENKY--
TdiB	-----DAMLPLVIGDCLDPRTHKNAKRVCIYHTSSNSFAVVRDVLTLGGRRLS-DDTSIKRVETLKSFWLILINELGPGQSDAATME
* * *	
SirD	DQELPSVPHR---TSGVLYYFEIK-PTSDAIVPKVIYIPVRHYASNDLSIAQGLATYFERRG-QTVAENVDALSDIFSHRSLDSGLGLHTYISCTFFKTK
7-DMATS	DAELPQNSHR---TAGTIFNFELR-PGKWFPEPKVYLPVRHYCESDMQIASRLQTFFGRGL-WHNMEDYCKHLEDLPPHPLSSSTGTHTFISFSYKQK
FgaPT2	YLPGLVPIDE---RLPLMANFTLH-QNDPVPEPQVYITV---FGMNDIAVADALTRFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADHKLNYLHAYISFSYRDT
MaPT	YLPGLGARPE---LPLSMANFTLH-QNDPVPEPQVYITV---FGMNDIAVADALTRFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADHKLNYLHAYISFSYRDT
DMATS-Cp	YLPGLGEIENE---QLPSMANYTLH-HNDPMPEPQVYITV---FGMNDIAVADALTRFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADHKLNYLHAYISFSYRDT
DMATS-Cs	YLPGLKINE---QLPSMANYTLH-HNDPMPEPQVYITV---FGMNDIAVADALTRFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADHKLNYLHAYISFSYRDT
FtmPT2	DFAFGTPPPEDYRPMANNTLS-PKKKFPDPQIYLLT---FGMNDIAVADALTRFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADHKLNYLHAYISFSYRDT
FtmPT1	FCELGKSSAG-EPAPMMFHLHDSQSPPDPQMYCVV---FGMNSKRLVEGLTTFYRRVG-WEMASHYQANLANYPDEDEKAAHLCAVYSAYNGG
EAW25546_NCBI	EFVDNEEQKQKFPPLTWNYELQ-PGISHPLTKLYFPV---FGMNDIAVADALTRFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADHKLNYLHAYISFSYRDT
EAW25546_FGENESH	EFVDNEEQKQKFPPLTWNYELQ-PGISHPLTKLYFPV---FGMNDIAVADALTRFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADHKLNYLHAYISFSYRDT
AnaPT	-----QLPLVNVYELS-SGSATPKPKLYLPL---HGRNDEAMANALTKFVDYLG-WKGLAQYKDLIYANNPCRNLAETTTQQRVAFSAYTESG
CdpNPT	-----MEKGLPLIMLYEMK-ACQRLPKPKLYLPL---HGRNDEAMANALTKFVDYLG-WKGLAQYKDLIYANNPCRNLAETTTQQRVAFSAYTESG
FgaPT1	-----WQVWVELR-TDVPFVVKLYFSV---AAEDHYVSDTVVLEIDYLG-WDDLVQTHRALMDEAWSLGQTKSYLAFSISVTFHSIK
TdiB	SWSKPERNRTGYSGIYQYTIET-PQAIPTKLYVPLFYQYDTSSEVAERNFESALKKLGNELGSGKYSVMQEIFK---DVENYQTYAFSAYTESG
* * *	
SirD	GLSVTSYFNPFIYHPNRYQ-----
7-DMATS	GVYMTMYNLRVYST-----
FgaPT2	-----PYLSVYLQSETGDAWANLSESKVKQDAACQPTALPPDLKSTGVVYSGLH-----
MaPT	-----PYLSVYLQSETGDSWSTGELS-----YIRSF-----
DMATS-Cp	-----PYLSVYLHTETGRWPFVADSP-----ISFDAYRCELSTK-----
DMATS-Cs	-----PYLSVYLHTETGHWPFVADSP-----TAFDAYRCDMASKINLADY-----
FtmPT2	-----PYLSVYYSF-----
FtmPT1	-----AYVTLYNHSNFPVGVSPFN-----
EAW25546_NCBI	-----GAYISVYYSKRSL-----
EAW25546_FGENESH	-----GAYLTVYHAGVGMKNL-----
AnaPT	-----GPYLSIYVFE-----
CdpNPT	-----GPYITTYGNBSGRPVF-----
FgaPT1	-----GVYTTSYVAMPIDKDEGGGSLAGDFGRN-----
TdiB	-----

Abb.7-2: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 12 ausgewählten Prenyltransferasen mit den vorhergesagten Sequenzen von CdpC2PT zur Exonvorhersage. Abkürzungen: EAW25546_NCBI, NCBI-vorhergesagte Proteinsequenz bestehend aus 1 Exon; EAW25546_FGENESH, vorhergesagte FGENESH-Proteinsequenz bestehend aus 2 Exons. Für Accession-Nr. der einzelnen Enzyme siehe Abb. 7-1.

7.1.4 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit EAW09999

FgaPT2	-----MKAANASSAEAYRVLRSRAFDNEDQKL--WW
MaPT	-----MSTTESLTASHQAVKILSDVFEESNDQKL--WW
DMATS-Cp	-----MSTAKDPGNVGVILSLIDFFSNQRL--WW
DMATS-Cs	-----MATNESGRGVDTLSLIDFFDDEQRL--WW
FtmPT2	-----MTITFTEISCFEDADQLLDKSWFESDDQR--WW
FtmPT1	-----MPPAPDPQKPHQLQAPYRALSLSLFGSVDER--WW
EAW09999_NCBI	MSKFFVGAKPFSHAEISPCCHKPDIPCVPRNLHSIKHQTITMTVTAPSIPETIPENAEILFKGKTPRIGVHTPTHTSSNDLTSTWLVGANEHVRA--WW
EAW09999_FGENESH	-----MTVTAPSIPETIPENAEILFKGKTPRIGVHTPTHTSSNDLTSTWLVGANEHVRA--WW
AnaPT	-----MSPLSMQTDVQGTAEKNSLETNGTSNDQQLPQKVLGSLGLPTIEQEQ--YW
CdpNPT	-----NDGEMTASPPDISACDTSVDEQTSQSQSQAPIKDIAYHTLTKALFPIIDIDQYQ--YW
7-DMATS	-----MSIGAEISLVPAPPGLNGTAAQYPAKTQKELSDGDAHDGLSLAQLTPYDVLTAALPLPAPASSTGFWW
SirD	-----MQTARLFQNLNLAAANIRDYKKEQRNLGVVLSLNGMLRLDYEDTRF--WW
FgaPT1	-----MTKTDAGQRHPQETATHAATDEEVQDQWRAPFVLSRLTVFQHEHRL--WW
TdiB	-----MATEY--WS
: : : *	
FgaPT2	HSTAMPFAKMLETAN-YTTFQCYQLITYKECVIPSLGCTPNSAP-----RWLSILTRYGTPFELSLSN-----CSNSIVRYTEPINQHTGTDKDP
MaPT	HSTAMPFAEMQLSAN-YDAHAQYRHLAIYKKHVIPLGVYPTNDRD-----RWLSILTRYGTPFELSLSN-----CNSDVRYTEPINATGTEDAP
DMATS-Cp	HSTAMPFAAMLDNAG-YNIHDQYRHLGIFKKHIIPLGVYPTKDE-----RWLSILTRYGTPFELSLSN-----CNSDVRYTEPINATGTEDAP
DMATS-Cs	HSTAMPFAAMLDNAG-YNIHDQYRHLGIFKKHIIPLGVYPTKDE-----RWLSILTRYGTPFELSLSN-----CNSDVRYTEPINATGTEDAP
FtmPT2	EYTGPIYLLKLRDAK-YFQKDVPCVLYLQQLHVLPLGFPFVQAP-----LPWNSWNTTYGVFELSLSN-----LLNLTVRIGVDPVTDASTAQDP
FtmPT1	HSTAPILSRLLISSN-YDVQVQYKLSLYRHLVLPALGPYQRPDPTGIIA--TQWRSGMVLTLPIESNN-----VARALLRIGVDPVTDASTAQDP
EAW09999_NCBI	DALGQIASLADAEAG-YKMLAQTEILLHLSVLLPHLGRYPPIQEKAP-----VEYRWTCGTGDEHDHE-----HDHPTLTIAEAAGDAKSTSHLT
EAW09999_FGENESH	DALGQIASLADAEAG-YKMLAQTEILLHLSVLLPHLGRYPPIQEKAP-----VEYRWTCGTGDEHDHE-----HDHPTLTIAEAAGDAKSTSHLT
AnaPT	LNTAPYNNLLIQCG-YDVHQYQYLAFYHRLVPLGVFPIRSSAEAN-----YISGFSAEYPMELSVNYQ-----ASKATVRIGCEPVGEAGTSQDP
CdpNPT	HHVAPMLAKMLVDGK-YSHHQYQYLAFYHRLVPLGVFPIRSSAEAN-----YISGFSAEYPMELSVNYQ-----ASKATVRIGCEPVGEAGTSQDP
7-DMATS	RETGPVPLSKLAKAN-YPLTHYKYLMLYHHTLPLGFRPPLENSTHPSPSNAPRSFLTDDFTPLEPSWNVNCSAEQSSVRISIEPIGKAGTQADP
SirD	TTTAPMLGRMELIG-YDQDAQKHLFFYYIYVPLSGRRSPGEGYPTG-----VNSFMTDDYSPLSLSDWVG-VAEQSSVRISIEPIGKAGTQADP
FgaPT1	ERAAKSLATYLRK-YSVSQYQHLMLFYSVYAPNLGFWPNDKRDN-----VHWCGICPGGENLEISMNYQGG-----AKCTVRIGCEPVGEAGTSQDP
TdiB	RHLRSVLAPLFAAGTYSPEQESHAFIDEIAPNLGLPWEHPHG-----YSTPSSLVGSPFDPINIVS--SGKAKVRIGCEPVGEAGTSQDP
: : : *	
FgaPT2	-FNTHAIWESLQHLPLEKSIDLEWRFHKHDLTINSESAFLAHNDR---LVGGTIRTQNKALDILK-DGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFSGV
MaPT	-FNTHAIWESLQHLPLEKSIDLEWRFHKHDLTINSESAFLAHNDR---LVGGTIRTQNKALDILK-DGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFSGV
DMATS-Cp	-FNTHAIWESLQHLPLEKSIDLEWRFHKHDLTINSESAFLAHNDR---LVGGTIRTQNKALDILK-DGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFSGV
DMATS-Cs	-FNTHAIWESLQHLPLEKSIDLEWRFHKHDLTINSESAFLAHNDR---LVGGTIRTQNKALDILK-DGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFSGV
FtmPT2	-FNTHAIWESLQHLPLEKSIDLEWRFHKHDLTINSESAFLAHNDR---LVGGTIRTQNKALDILK-DGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFSGV
FtmPT1	-FNTHAIWESLQHLPLEKSIDLEWRFHKHDLTINSESAFLAHNDR---LVGGTIRTQNKALDILK-DGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFSGV
EAW09999_NCBI	RHHLQATQQLLELLASQLPSVSIRWYRHFVQAHDHDMHSHSHRHS---RHTDADRPTPLAFEFADTGVVPRVYFSPPAQAEQKPSLAIFTDAI
EAW09999_FGENESH	RHHLQATQQLLELLASQLPSVSIRWYRHFVQAHDHDMHSHSHRHS---RHTDADRPTPLAFEFADTGVVPRVYFSPPAQAEQKPSLAIFTDAI
AnaPT	-MNQMTREVLRSLRDLPTFDRLDLYFDSQSLSLTTSEANLASKLI---KQRQSK---VIAFDIK-DGAILPKAYFFPKGSLASGTPVQDQAFNAI
CdpNPT	-FNRTSVNAFFSQQLLVKSVNIELHLLSHLTLTAKDERNNEEQLTQYLTNFQVTKQYVVALDIRKTGIVAKYFPPGKSLAVTGRSTDELLVNAI
7-DMATS	-FNQAAVTFQMHSEYATEVGGATITLDEHFRNDFVFGPEYTAIRAKIP---EGEHTQSFPLAFDID-AGRVTTKAYFFPPLMSLKTGTSTTKVVSISI
SirD	LNQKMYQLVDGLRPAFHTDLTLEDFSEALTISREKFGTRKLSLE---GRSQYFVAFDID-VGHPRLKAYFMPGLKSIENPTGFSEALVVKAM
FgaPT1	-FNLAEKKMIEDLKALQPNLNTWENHFRQREVLVEEVAANNDEIIS---KVPFKNQRHLGLDLS-EGAFMLKSYFMPATRSALTGVENTQIMFESI
TdiB	-FAEGSAREILHRLDLVG-ADTQWGMYLMDALYLTPAEAEVAKTKLP---PGVAIPSSVGFDFD-GPERTLKFIYPSVRKALATQDQVSEMLMLKTL
: : : *	
FgaPT2	RRLAVREP-RILPPLNMLEEYIRSR-----GSKSTASPRLVSCDLTSPAKSRIKIYILEQMVSLSEAMDLWTGGRR-DAST
MaPT	RDLTKQQA-NISSSLGMLIEDYLECR-----GPESTACPRLLSCDLTSPAKSRIKIYILEQMVSLSEAMDLWTGGRR-DAST
DMATS-Cp	RDLTKQQA-NISSSLGMLIEDYLECR-----GPESTACPRLLSCDLTSPAKSRIKIYILEQMVSLSEAMDLWTGGRR-DAST
DMATS-Cs	RDLTKQQA-NISSSLGMLIEDYLECR-----GPESTACPRLLSCDLTSPAKSRIKIYILEQMVSLSEAMDLWTGGRR-DAST
FtmPT2	ERIALPG---LKEPVHRIHRLSTLQDQ-----DGHPTDIAAPFLGVDLCTEPERSRLKFFVTDQVSWDRADMMWTIRGRLDEPQC
FtmPT1	RKVDREG---RFETQLANIQRYIERRRRGLHVPVGTADKPPATADEKAFDACSFPFHLSTDLVEPGRSVKVFYASERHVNLMQVDEITFGGLRR-DEDA
EAW09999_NCBI	RPLSESVS---LLAFEEFVAFVDN-----HPVGVTLTPEVLGVDCAAASAS-LYLHHTPLTNFESVAILTLGGGVH--GRD
EAW09999_FGENESH	RPLSESVS---LLAFEEFVAFVDN-----HPVGVTLTPEVLGVDCAAASAS-LYLHHTPLTNFESVAILTLGGGVH--GRD
AnaPT	KTIVASQV---IESPLRVLTFTVTKLES-----KPTVTSDFILAVDCIPEKSRKIYIVADSQLSLATREFWTLGGGSVT-DAST
CdpNPT	RAVDKDG---HDSLCQLIEAHFQ-----QSKIDDAFLCCLVDPAHTRFKVYIADPLVTLARAEHWTGGGLT-DEDA
7-DMATS	LHIALKSE-LNMGVQITIAAMSVMEAWIG-----SYGGAATEMISVDCVNEADSRKIYIVRMPHTSLRKEVQKFLKRNQKPCAEGLAR
SirD	DACELHFGSLFMQAFRRINSDELAFS-----ATSYHRPEIEIVGIDCVSPVKSRAKIYIRHRGTSFDSVCRMLSMGARAP--LD
FgaPT1	RKINLKNALFISALSTIEDMMVPTNG-----RFMEYWDGISYDAVDACARIKIYITIRKKSIEHARDVWTLGGGLQ-GEDI
TdiB	RGLQPLGS-ELVPAMDILIASYLSTRN-----DAMLPLVGDICDLFRTKKNARKVICYLHTSSNSFAVVDVTLGGGLS-DDTS
: : : *	
FgaPT2	LEGSLVRELWD-LIQSPGLKSYAPYLPGLVIPDE---RLPLMANFTLH-QNDPVPEQVYFTTFGMN--DMAVADALTFFERHGWSEMAITYET
MaPT	LALGLLQELWD-LIQIPPLRSYEPGYLPGLGARPE---LPLSMANFTLH-PDHPVPEQVYFTTFGMN--DMAVADALTFFERHGWSEMAITYET
DMATS-Cp	MDGLDMRELWS-LIKVPTGHLEYPKGYLGEIPNE---QLPSMANFTLH-HNDPMPEQVYFTTFGMN--DAEISNALTIFFRHGFDDMAKNYRV
DMATS-Cs	MDGLDMRELWN-LLEMPAGLQAYPKPYLQGLKIPNE---QLPSMANFTLH-HNDPMPEQVYFTTFGMN--DAEISNALTIFFRHGFDDMAKNYRV
FtmPT2	ADGIALLRKWD-LIAIEGYRSNIRPDAFGTPPPED---YRPVMMANFTLH-PKKKFPDPQIYLLTVGMN--DAVWDLAVAEVFLGWTDLASTYKD
FtmPT1	LRGLRLHFWA-DIQREGYITMPRGCELGKSSAG---FEAPMMHFWHLDGSQSPFDPOMYVGVFGMN--SRKLEGLTTFYRVRGWEEMASHYQA
EAW09999_NCBI	LAIMELWELICA-MRLKHVNRTFSWDELPGERED---WHQGLRYCFEIM-PEREVPEVSDIPVAGYGR-DEDVVLGKELKRNQKPCAEGLAR
EAW09999_FGENESH	LAIMELWELICA-MRLKHVNRTFSWDELPGERED---WHQGLRYCFEIM-PEREVPEVSDIPVAGYGR-DEDVVLGKELKRNQKPCAEGLAR
AnaPT	MKGLRIEELWR-LIQDYDAVCSHSN---M---DQPLVNVNELS-SGSAFPPQLYLPLHGRN--DEAMANALTKWDYLGWKGSLAQYKK
CdpNPT	AVGLRIIRGLWS-ELGIIQGLPLEPSAMKEG---LPLMLNMYEMK-AGQRLKPKLYMPLTGIP--ETKIRIMTAFFGRHMDMPQEGVME
7-DMATS	KBGLKLDLDELWRTVFGIDDEDAELPQNSHR---TAGTIFNFELR-PGKWFPEPKVYLPVRHYCESDMQIASRQTFFGRGLWNEKDYCK
SirD	AASVASIRELWALVLGKDFPSDQELFSVHR---TSGLVLYFEIK-PTSDAIVKVIYLPVRHYASNDLSAQGATFFERHGWSEMAITYET
FgaPT1	EKGDFDLVARWRRDLDEEPSTCEMKY---WQVWMLR-TDVPEFVKLYFVSAANE--DHYVSDTVEILDYLGWDDLVQTHRA
TdiB	LKRVTILKSVWPLLNELEGPQSDAATDESWSKPERLNRTGYSIGQYTIET-PCQAPIDTKIYVPLQYTDSEVAERNFESALKKLG---NEWGLSG
: : : *	
FgaPT2	TLSYYPHADHDKLNYLHAYISFSYR-DRTPYLSVYLQSFETGDWAVANLSESKVKQDAACQPTALPPDLSTKVYVYSLLH-----YIRSF-----
MaPT	SLSKAYYPDENYTMNYVHAYISFSYR-KNKPYLGVYLQSFETGDSWSTCELS-----YIRSF-----
DMATS-Cp	FQDSYYPHDYFESLNYLHAYISFSYR-RNKPYLGVYLQSFETGDSWSTCELS-----YIRSF-----
DMATS-Cs	FQDSYYPHDYFESLNYLHAYISFSYR-RNKPYLGVYLQSFETGDSWSTCELS-----YIRSF-----
FtmPT2	KVASYPGPDCTKNTYTHSGVFSYR-HSKPYLSVYYSFF-----TAFDAYRCMDASKKINLADY
FtmPT1	NILANYDEDEKAAHLCAVYFAYK-NGGAYVTLNHSNFEVVDVSFPN-----VHMLRRK--TEHQPVLTHTVCSLQ-GGVLVKTSMEPEGLKQYQEE
EAW09999_NCBI	VHMLRRK--TEHQPVLTHTVCSLQ-GGVLVKTSMEPEGLKQYQEE-----VHMLRRK--TEHQPVLTHTVCSLQ-GGVLVKTSMEPEGLKQYQEE
EAW09999_FGENESH	VHMLRRK--TEHQPVLTHTVCSLQ-GGVLVKTSMEPEGLKQYQEE-----VHMLRRK--TEHQPVLTHTVCSLQ-GGVLVKTSMEPEGLKQYQEE
AnaPT	DIYANNPCRNLAETTTQQRWAFVSTESGAYLTAVYHAGGCMKGNL-----NQAAYE-KNLEATRYQAWLSFAYTKEKGPYLSIYFHE
CdpNPT	HLEDLFFHPLSSSTGHTTFLSFYKQKQGVYTMYNLRYST-----A.SDIFSHRSLGSLGLTYSICTF-KTGLSVTSTFNEIYHFNRYQ
7-DMATS	LWDEAWSLQTKSYLAFYSIVTFHSIKGYITTYGNFSGPREVF-----KYRSVMQEIFKVENYQGTYSASFYTE-KGYVYTSVAMPKDEGGGSLAGDFGRN
SirD	
FgaPT1	
TdiB	

Abb.7-4: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 12 ausgewählten Prenyltransferasen mit den vorhergesagten Sequenzen von EAW09999 zur Exonvorhersage. Abkürzungen: EAW09999_NCBI, NCBI-vorhergesagte Proteinsequenz; EAW09999_FGENESH, vorhergesagte FGENESH-Proteinsequenz. Für Accession-Nr. der einzelnen Enzyme siehe Abb. 7-1.

The mass spectrum shows relative intensity versus m/z. The base peak is at m/z 393.31. Other significant peaks are labeled at m/z 115.21, 122.09, 144.32, 141.30, 162.99, 190.94, 213.40, 217.34, 224.33, 242.22, 267.10, 279.13, 316.39, 332.09, 359.13, 360.26, 395.56, 425.50, 451.50, 480.40, 494.25, 522.50, 562.62, 580.35, 603.40, 610.39, 617.30, 623.38, 649.10, 684.46, and 703.50. The chemical structure of compound 1 is shown, which is a complex molecule containing a pyridine ring, a pyrrolidine ring, and a quinuclidine system. The molecular formula is $C_{32}H_{41}N_3O_7$.

Chemical structure of the compound is shown above the mass spectrum. The molecular formula is $C_{32}H_{41}N_3O_5$.

Mass spectrum data (m/z vs. Intensity, cps):

m/z	Intensity (cps)
123.50	~500
149.14	~500
162.09	~500
174.30	~500
186.34	~500
207.19	~500
214.03	~500
228.40	~500
242.30	~1.5e4
249.25	~1.5e4
258.06	~500
281.19	~1.5e4
298.18	~1.5e4
308.96	~500
319.23	~1.5e4
326.34	~1.5e4
329.15	~500
335.24	~500
347.16	~1.5e4
350.07	~1.5e4
362.38	~500
365.18	~1.5e4
379.20	~1.5e4
383.21	~500
394.10	~1.5e4
402.16	~500
416.28	~1.5e4
422.16	~500
432.32	~1.5e4
444.25	~500
458.14	~500
462.39	~8.5e4
466.28	~1.5e4
474.33	~1.5e4
475.46	~1.5e4
478.29	~3.5e4
486.27	~500
488.32	~1.5e4
500.22	~500
518.31	~1.5e4
530.35	~2.5e4
546.37	~2.5e4
558.56	~500
564.46	~1.5e4
570.19	~1.5e4
586.37	~1.5e4
602.35	~500
612.32	~500
616.41	~1.5e4

Abb.7-6: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von Fumitremargin B mit FtmPT3 (2b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 546,30.

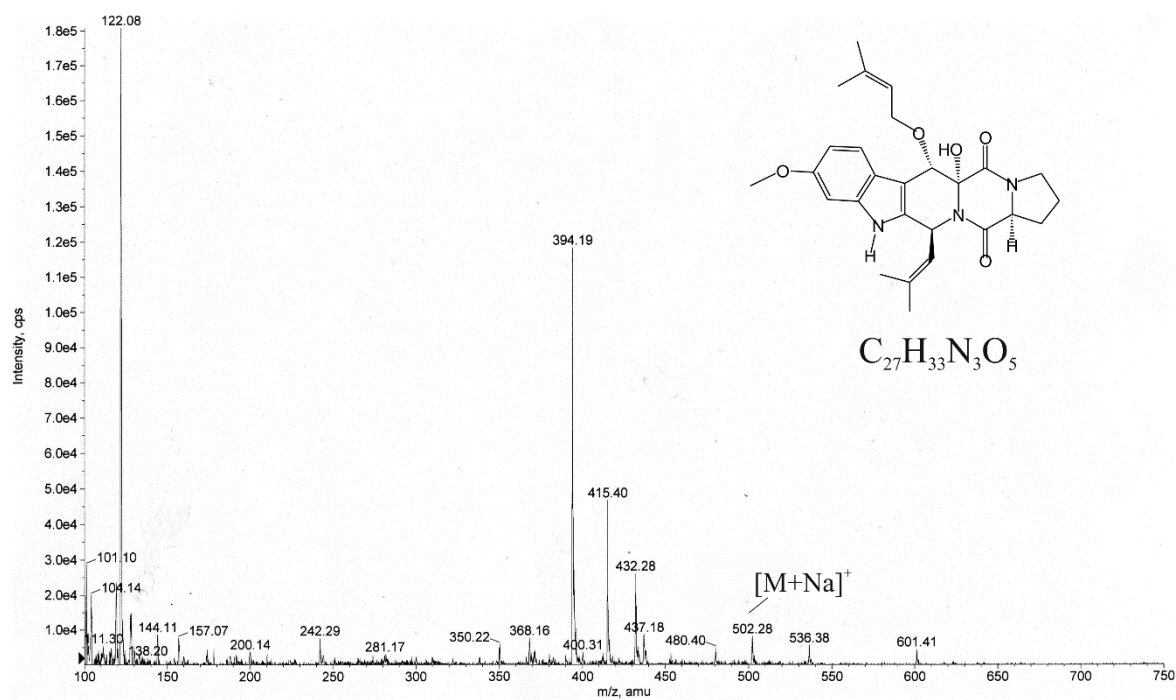


Abb.7-7: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von 12,13-Dihydroxymitragynin C mit FtmPT3 (3b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 502,23

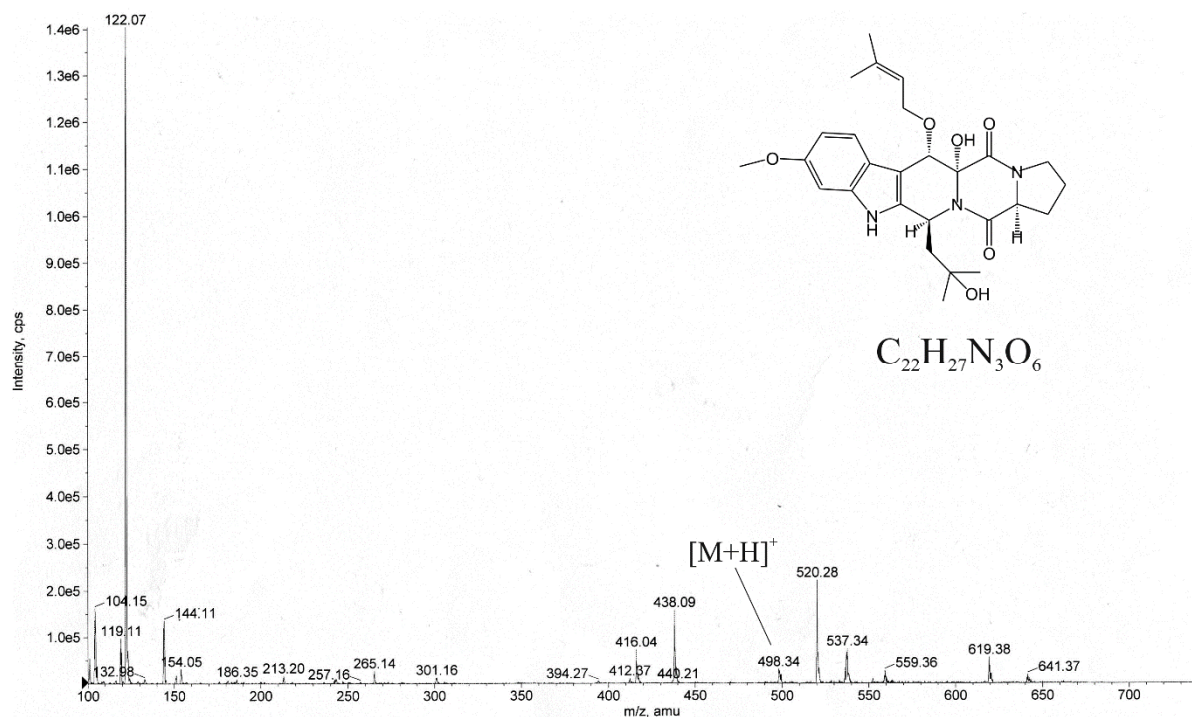


Abb.7-8: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von Verruculogen TR-2 mit FtmPT3 (4b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 498,26.

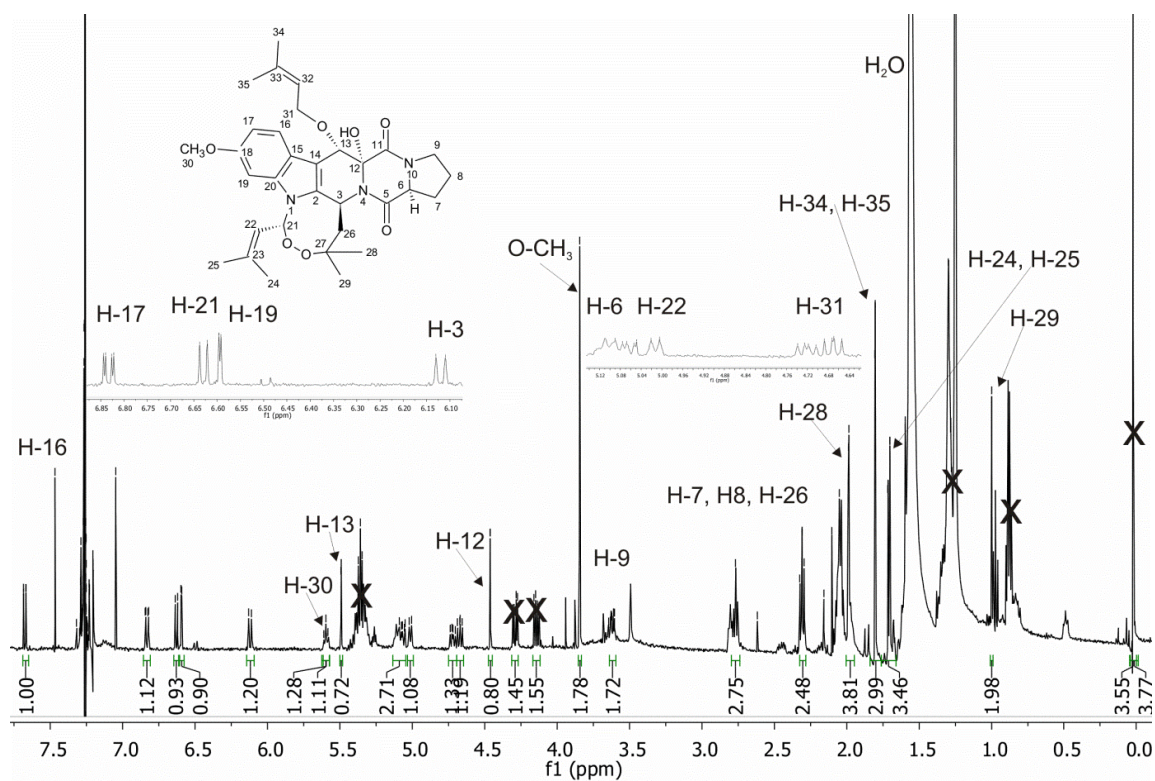


Abb.7-9: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von Verrucologen mit FtmPT3 (1b) in CDCl_3 (500 MHz).

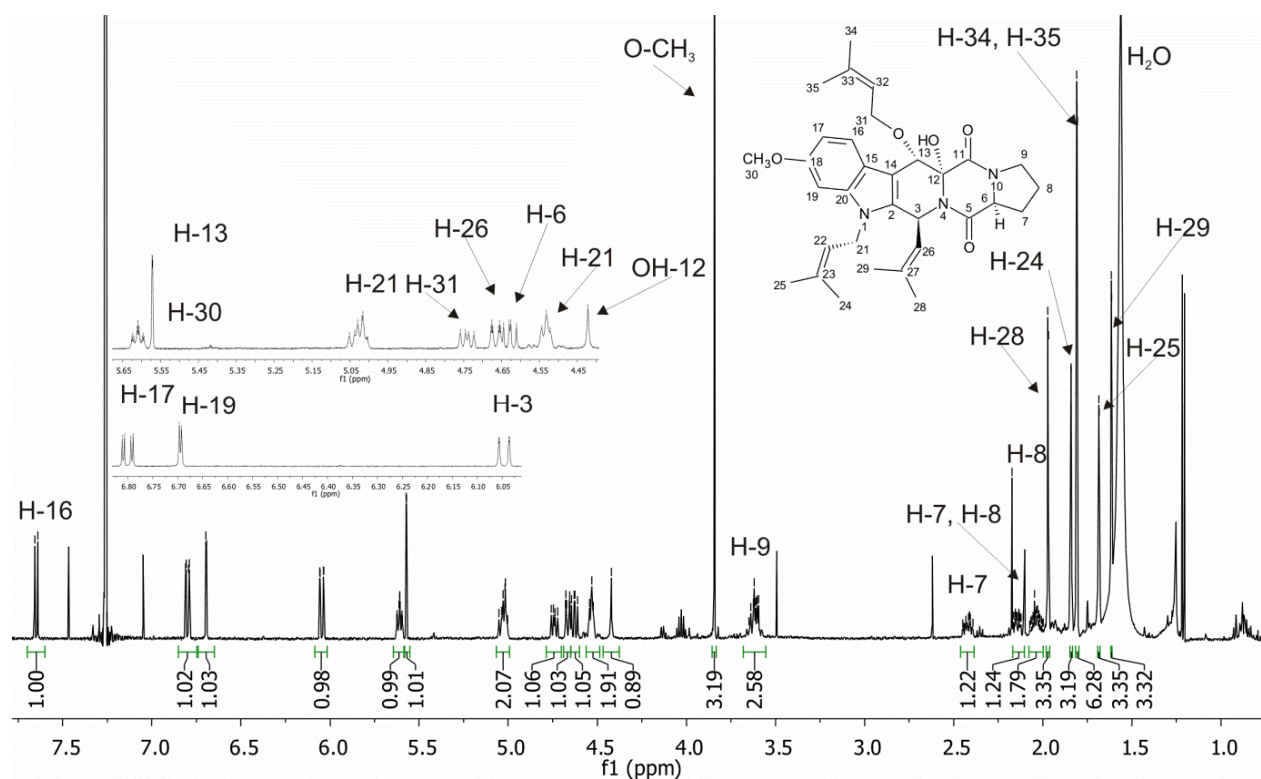


Abb.7-10: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von Fumitremorgin B mit FtmPT3 (2b) in CDCl_3 (500 MHz).

7.3 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus den CdpC2PT-Reaktionen

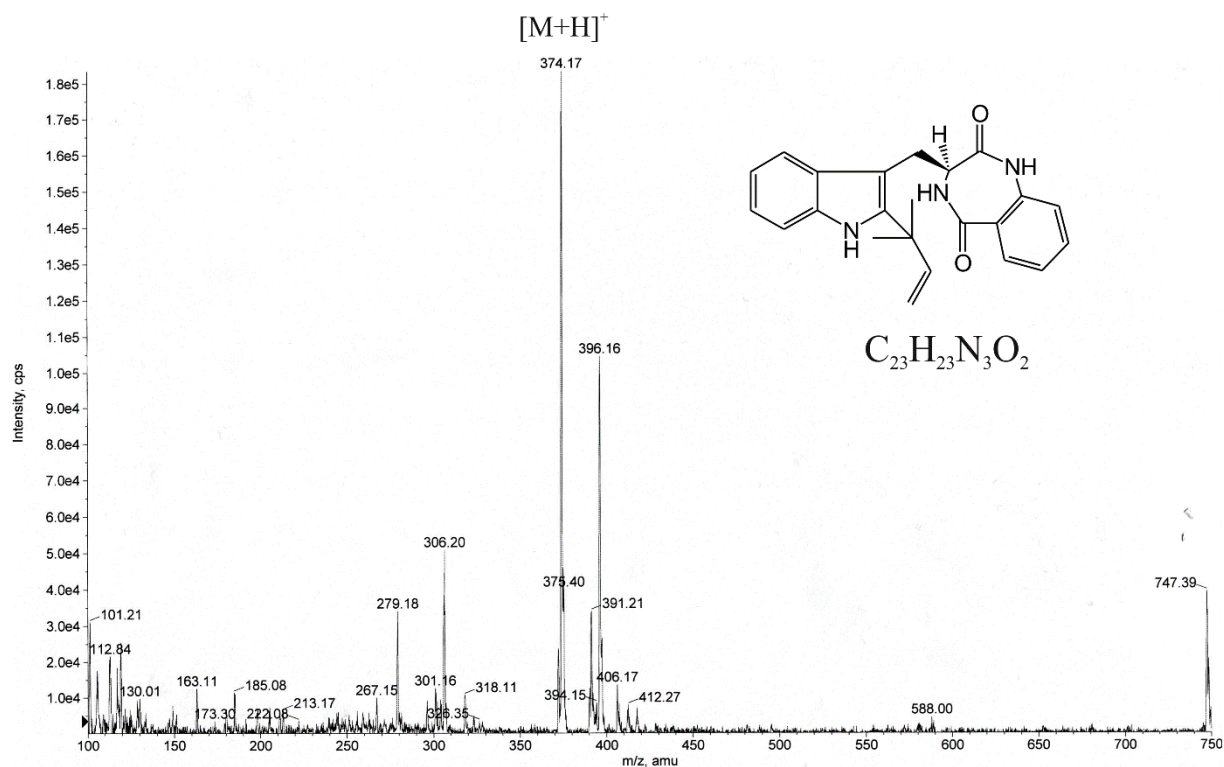


Abb.7-11: EI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von (*S*)-Benzodiazepindion mit CdpC2PT (6b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 374,18.

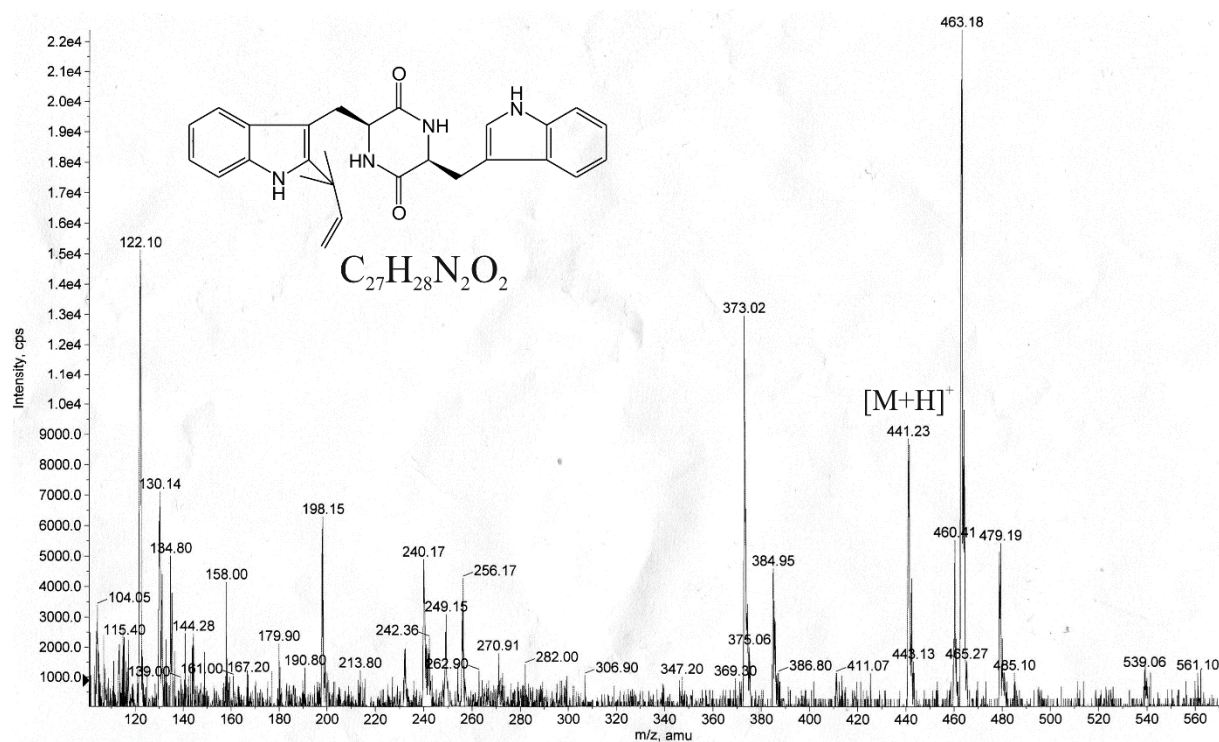


Abb.7-12: EI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von cyclo-L-Trp-L-Trp mit CdpC2PT (7b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 441,22.

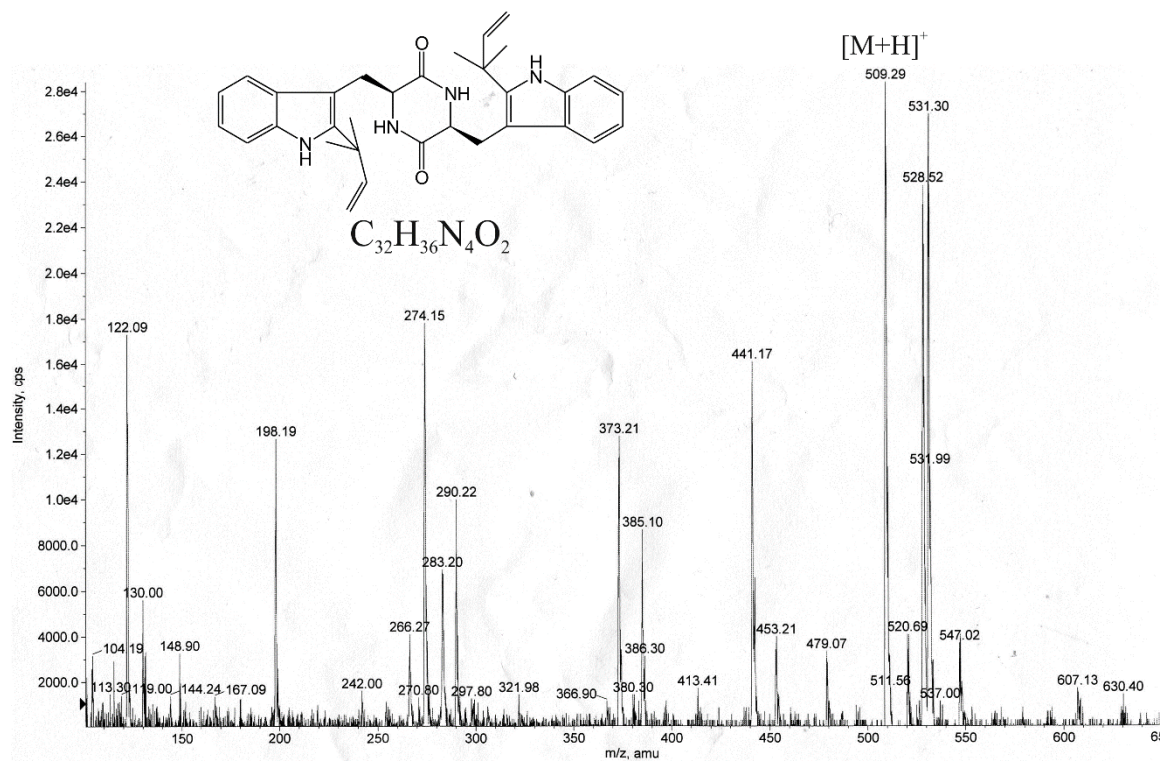


Abb.7-13: EI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp mit CdpC2PT (7c), theoretische Masse $[M+H]^+$: 509,28.

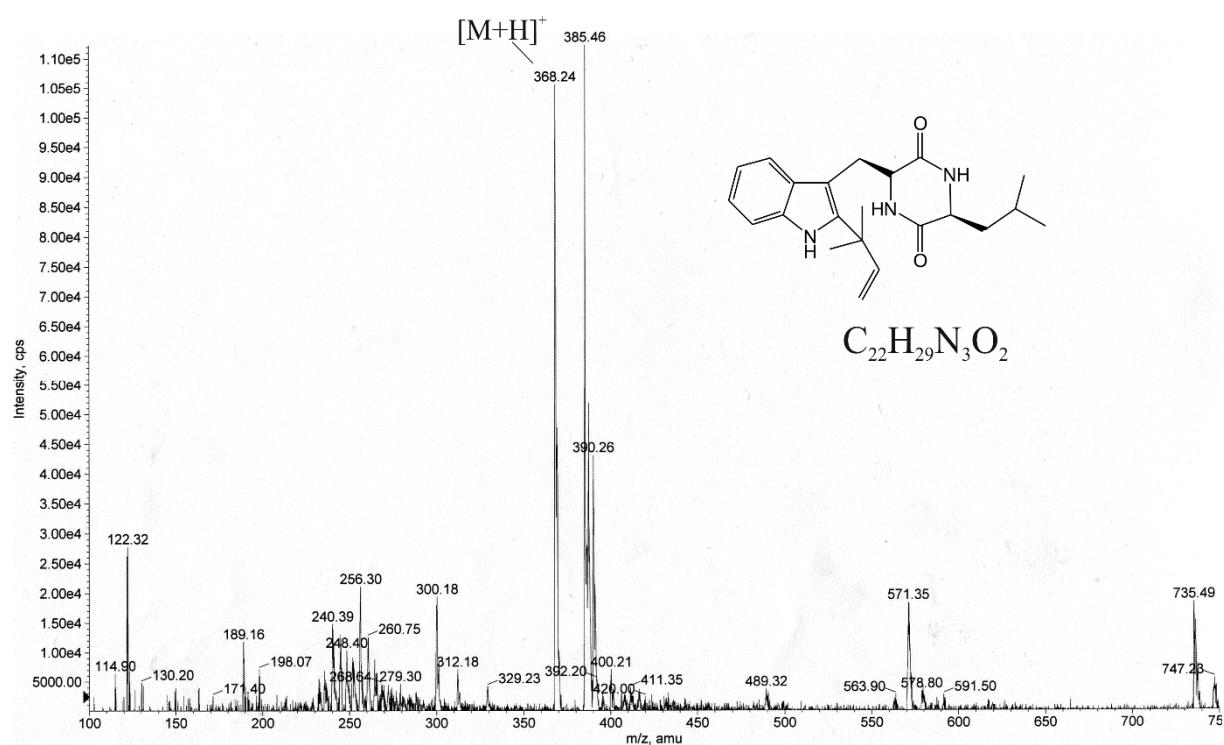


Abb.7-14: EI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von cyclo-L-Trp-L-Leu mit CdpC2PT (8b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 368,22.

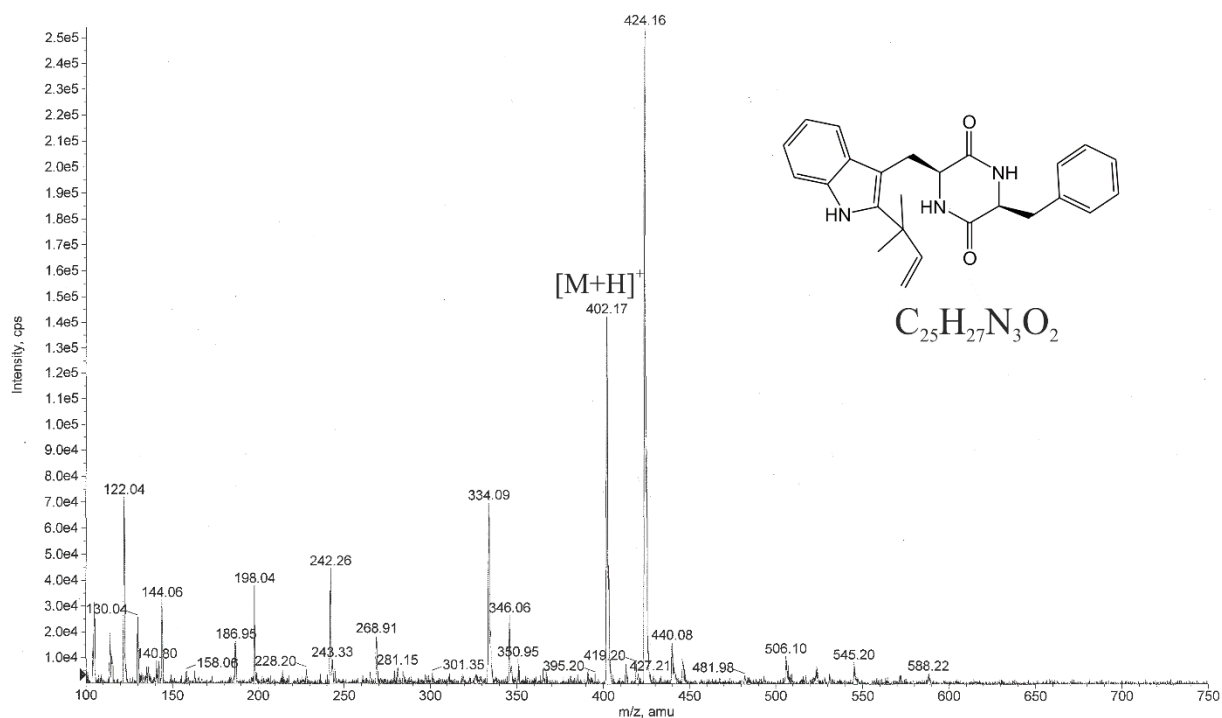


Abb.7-15: EI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von cyclo-L-Trp-L-Phe mit CdpC2PT (9b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 402,21.

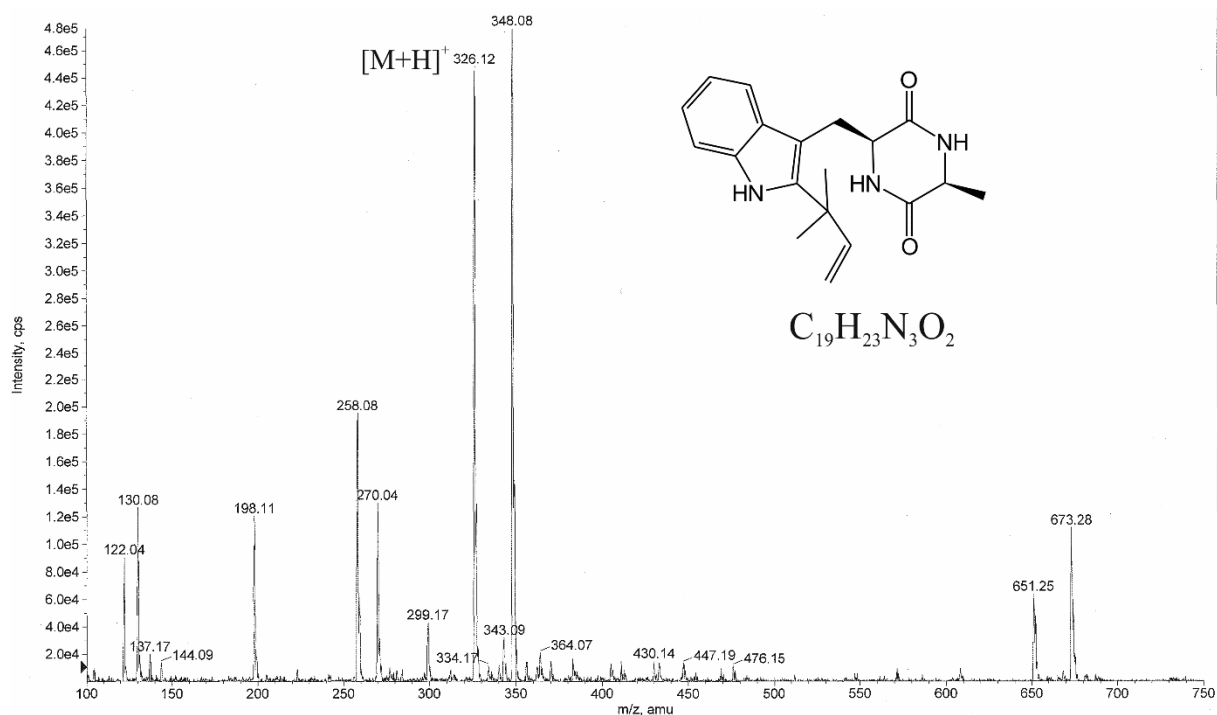


Abb.7-16: EI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von cyclo-L-Trp-L-Ala mit CdpC2PT (10b), theoretische Masse $[M+H]^+$: 326,18.

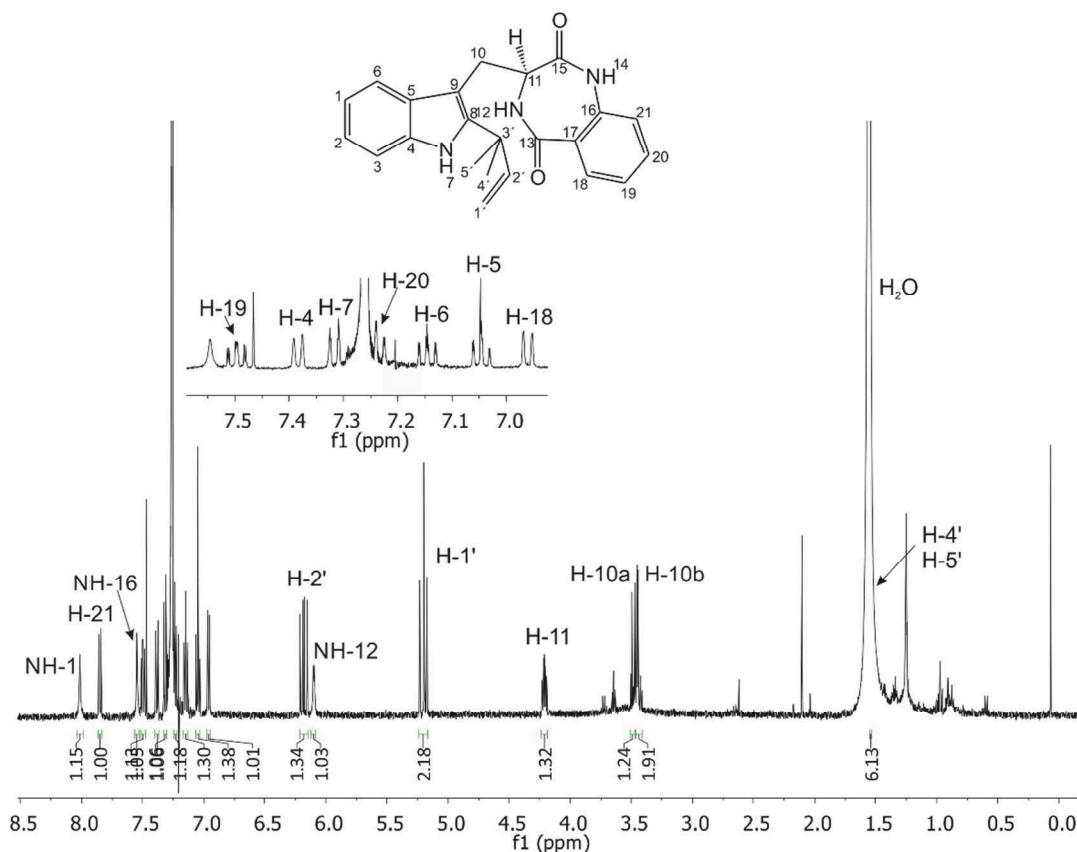


Abb.7- 17: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (S)-Benzodiazepindion (6b) mit CdpC2PT in CDCl_3 (500 MHz).

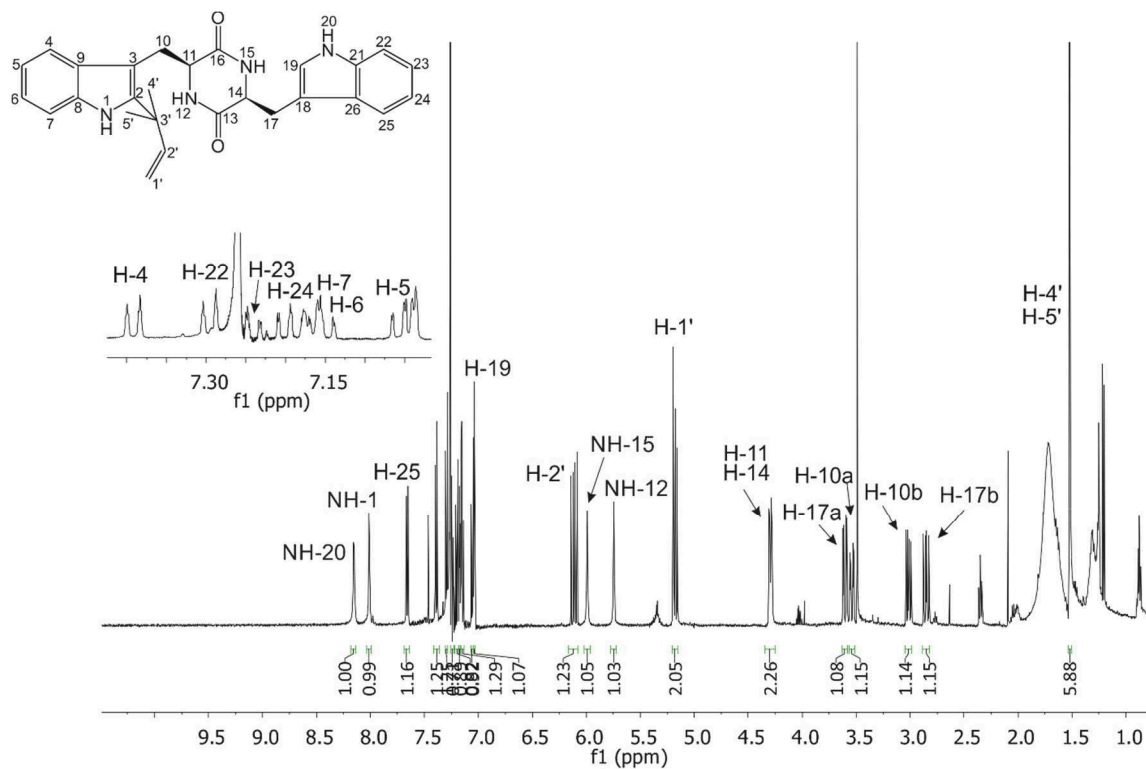


Abb.7-18: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von cyclo-L-Trp-L-Trp (7b) mit CdpC2PT in CDCl_3 (500 MHz).

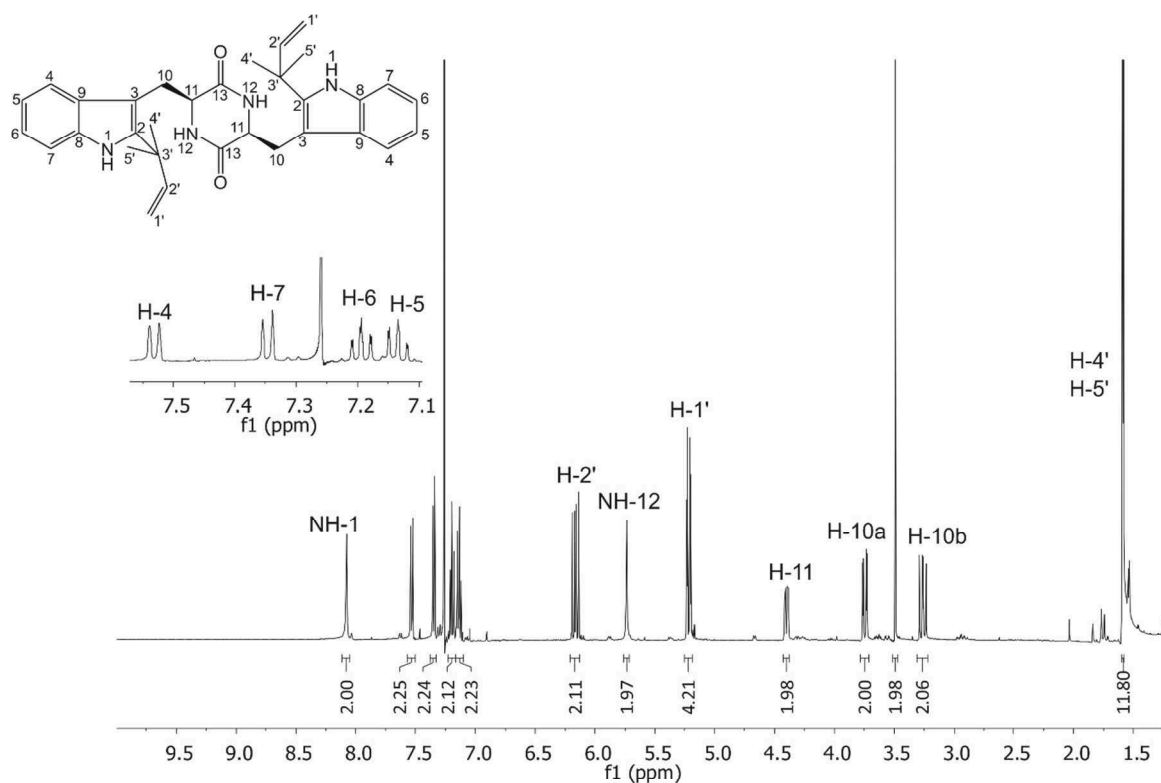


Abb.7-19: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von cyclo-L-2-tert-prenyl-Trp-L-Trp (7c) mit CdpC2PT in CD_3Cl_3 (500 MHz).

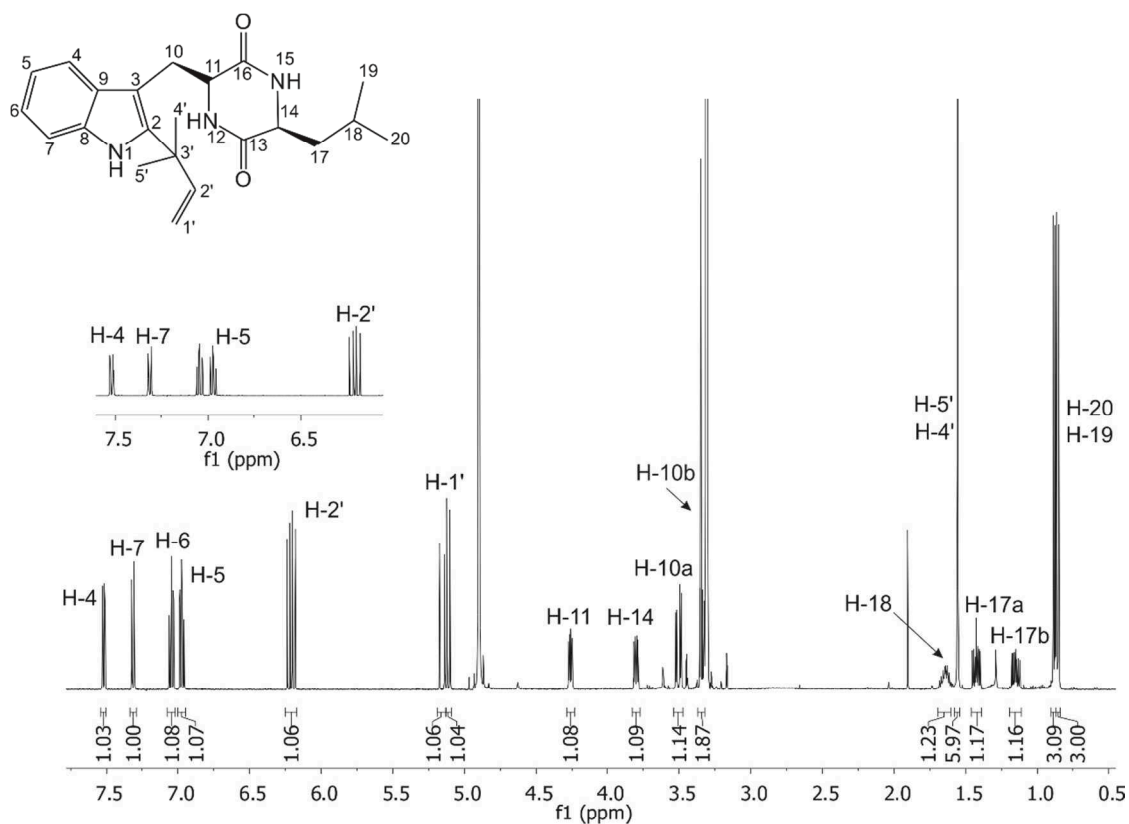


Abb.7-20: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von cyclo-L-Trp-L-Leu (8b) mit CdpC2PT in CD_3OD (500 MHz).

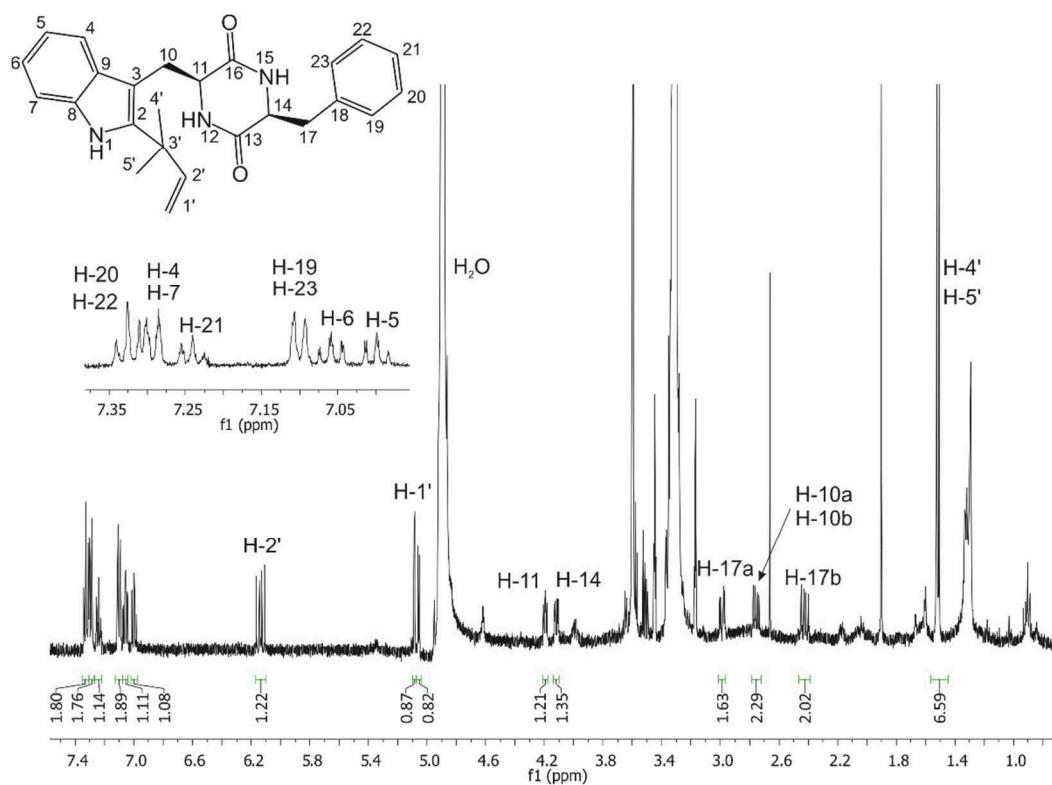


Abb.7-21: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von cyclo-L-Trp-L-Phe (9b) mit CdpC2PT in CD_3OD (500 MHz).

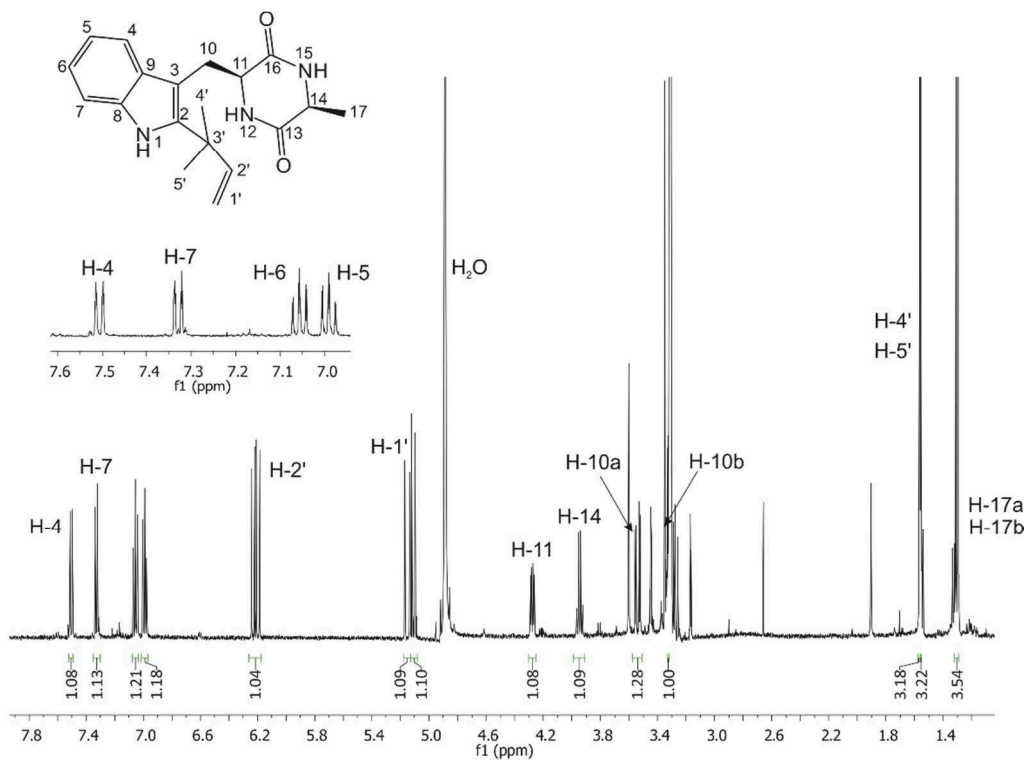


Abb.7-22: ^1H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von cyclo-L-Trp-L-Ala (10b) mit CdpC2PT in CD_3OD (500 MHz).

7.4 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanz cyclo-L-Trp-L-His aus den Transformanten *A. nidulans* KM01-03 (*Pc21g15480*)

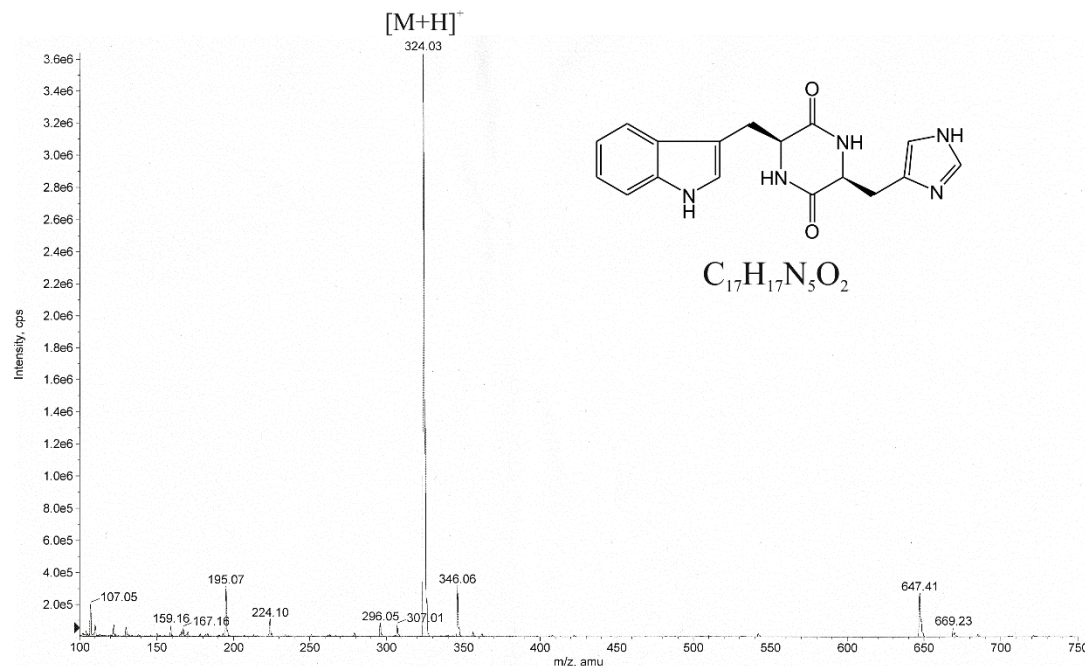


Abb.7-23: Positives ESI-MS-Spektrum des isolierten Produktes cyclo-L-Trp-L-His (24a) aus den Transformanten *A. nidulans* KM01-KM03 (*Pc21g15480*), theoretische Masse $[M+H]^+$: 324,14.

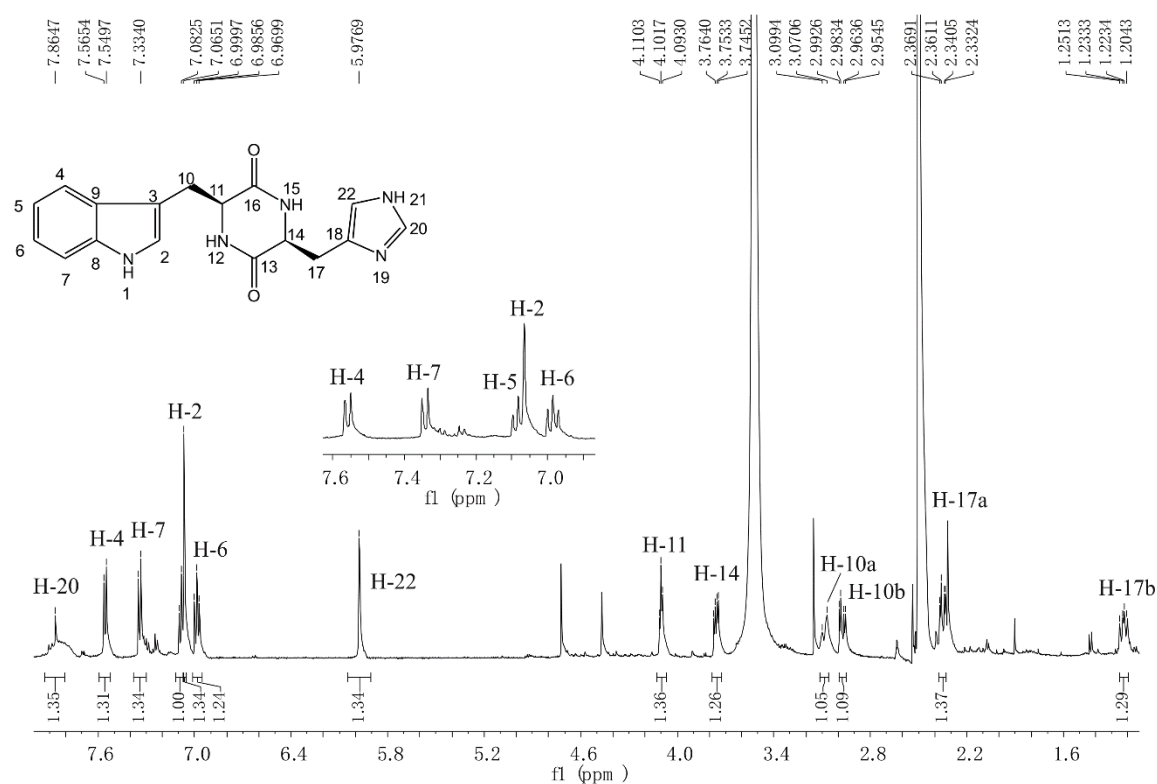


Abb.7-24: ^1H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produktes cyclo-L-Trp-L-His (24a) aus den Transformanten *A. nidulans* KM01-KM03 (*Pc21g15480*) in DMSO-d_6 (500 MHz).

7.5 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanz Pseurotin A aus dem Transformant *A. nidulans* KM12 (NFIA_074300)

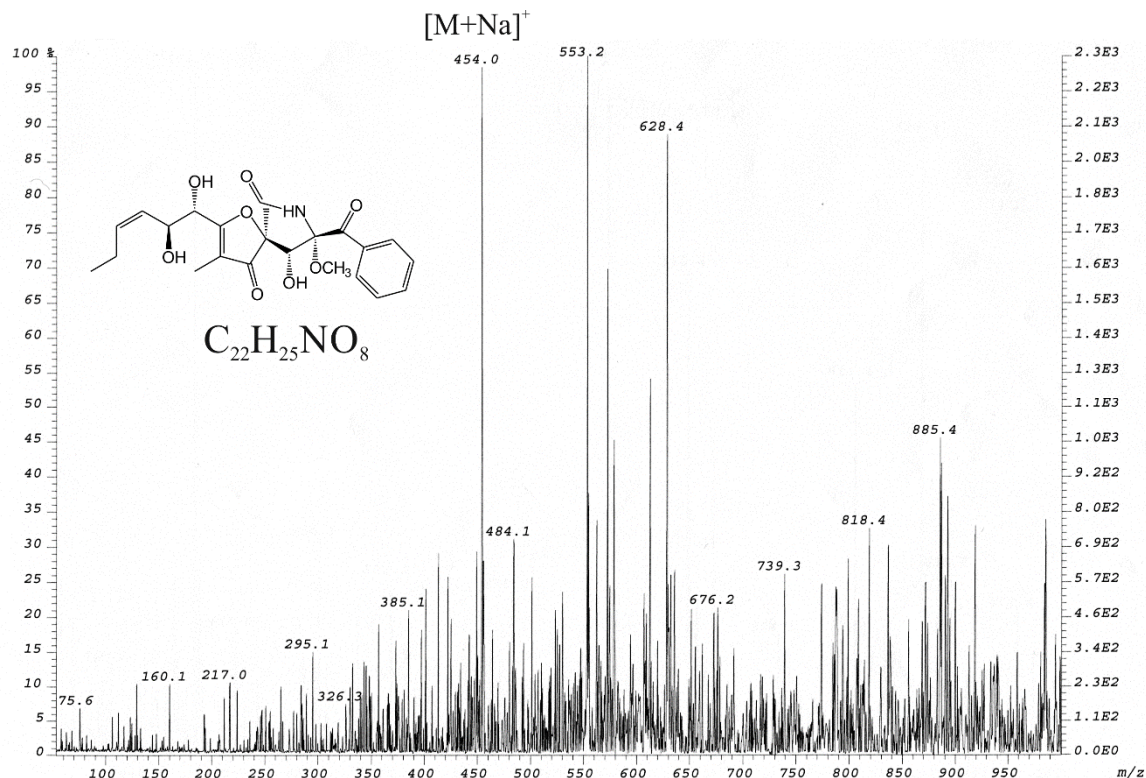


Abb.7-25: Positives ESI-MS-Spektrum des isolierten Produktes Pseurotin A (25b) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM12 (NFIA_074300), theoretische Masse $[M+Na]^+$: 454,48.

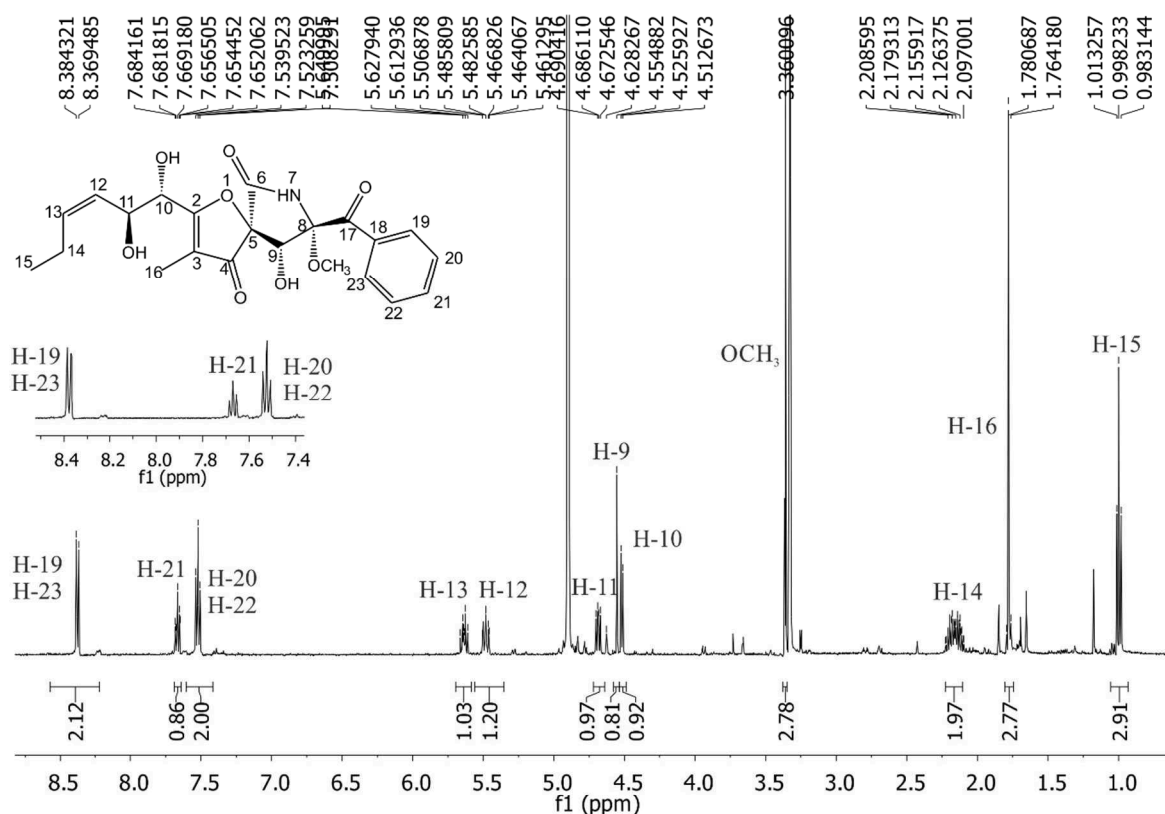


Abb.7-26: 1H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produktes Pseurotin A (25b) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM12 (NFIA_074300), in CD_3OD (500 MHz).

7.6 MS- und NMR-Spektren der isolierten Substanzen aus den Transformanten *A. nidulans* KM19 (*cdpC2PT*) und KM24 (*cdpC3PT*)

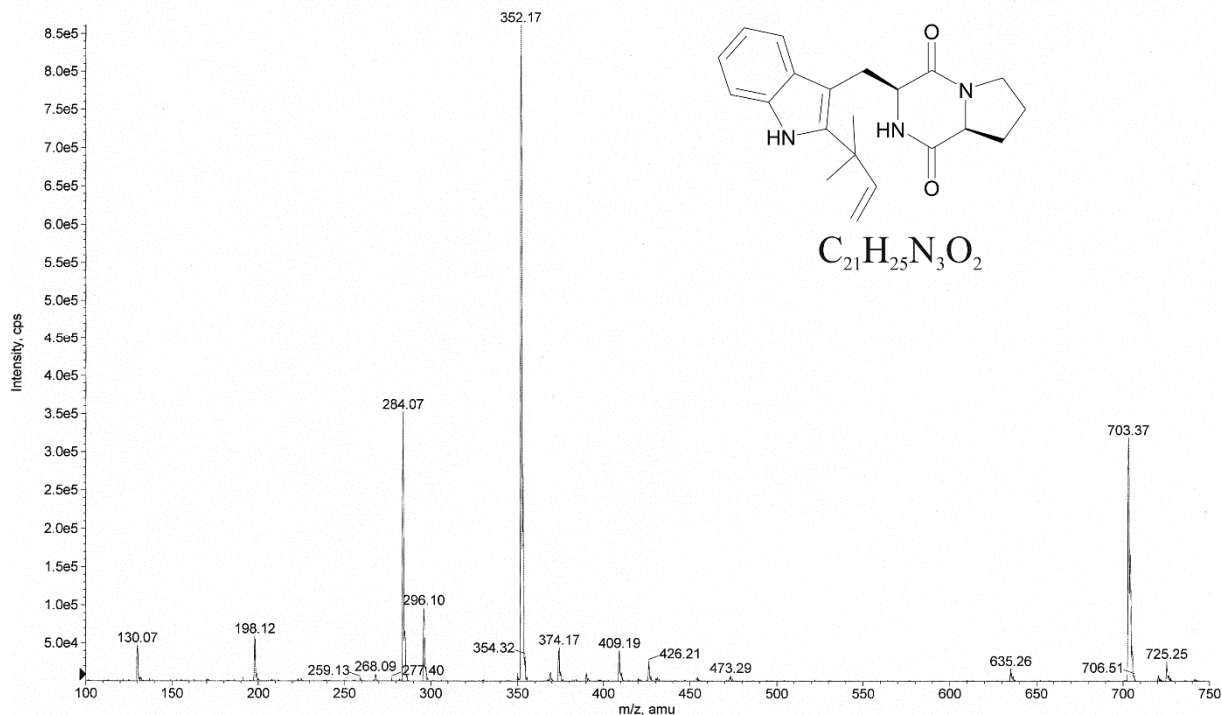


Abb.7-27: EI-MS-Spektrum des isolierten Produktes cyclo-2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26b) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM19 (*cdpC2PT*), theoretische Masse $[M+H]^+$: 352,45.

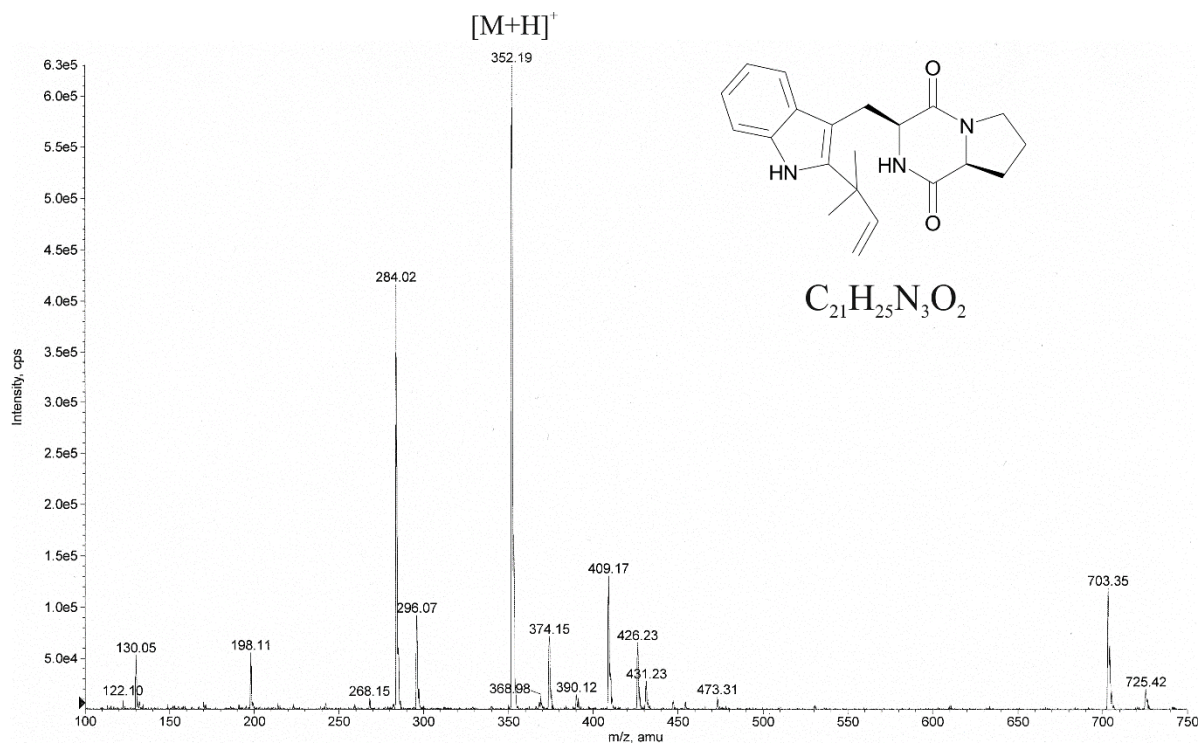


Abb.7-28: EI-MS-Spektrum des isolierten Produktes cyclo-2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26b) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM24 (*cdpC3PT*), theoretische Masse $[M+H]^+$: 352,45.

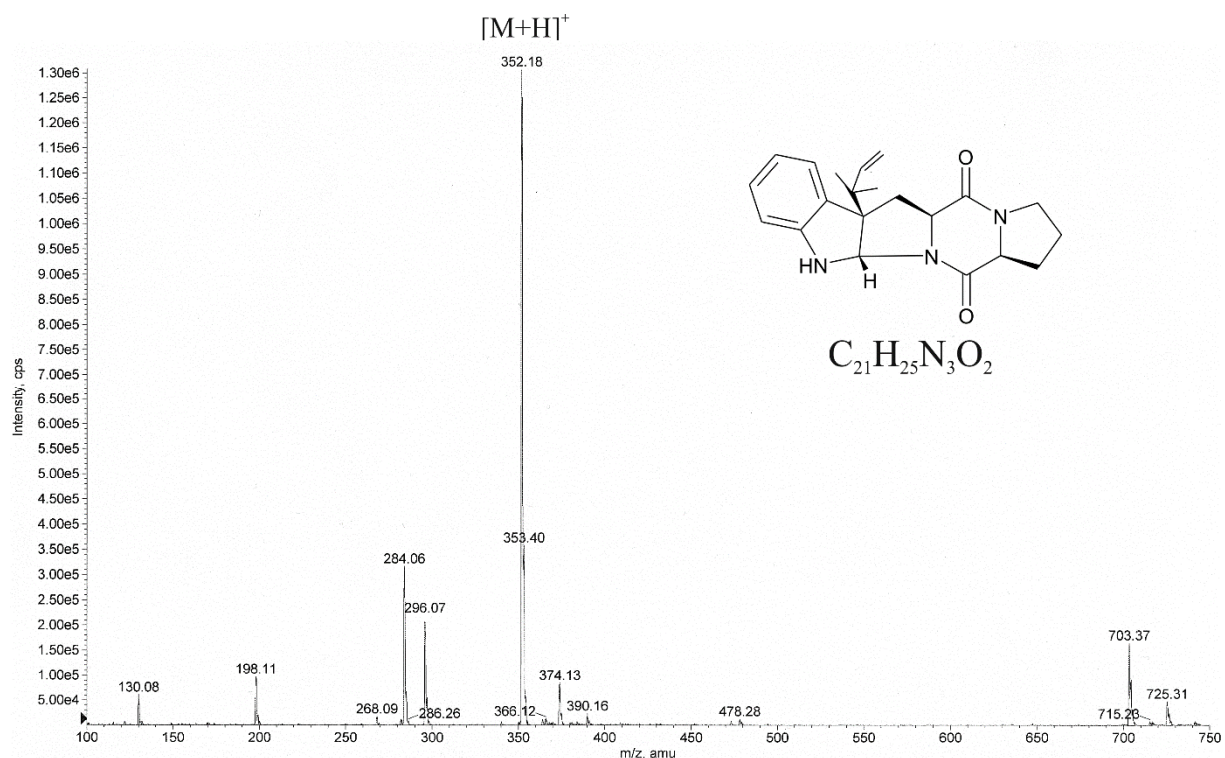


Abb.7-29: EI-MS-Spektrum des isolierten Produktes cyclo-3-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26c) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM24 (*cdpC3PT*), theoretische Masse $[M+H]^+$: 352,45.

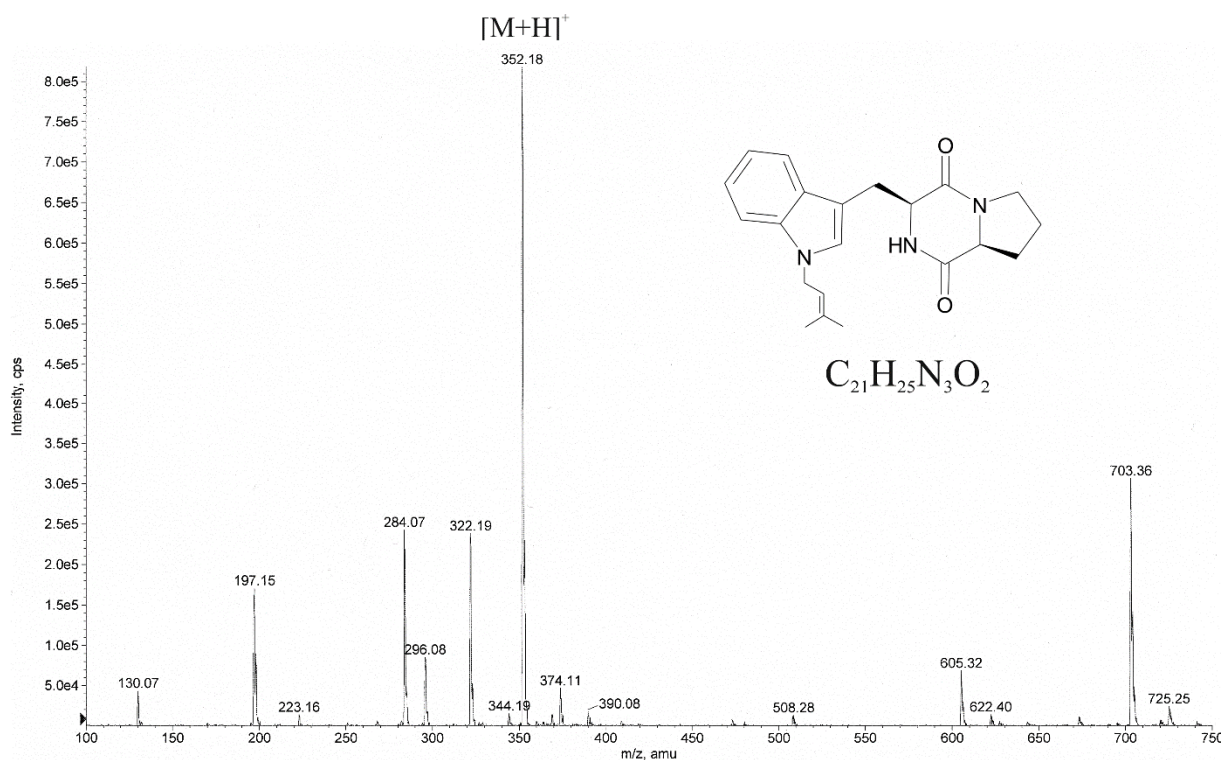


Abb.7-30: EI-MS-Spektrum des isolierten Produktes cyclo-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26d) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM24 (*cdpC3PT*), theoretische Masse $[M+H]^+$: 352,45.

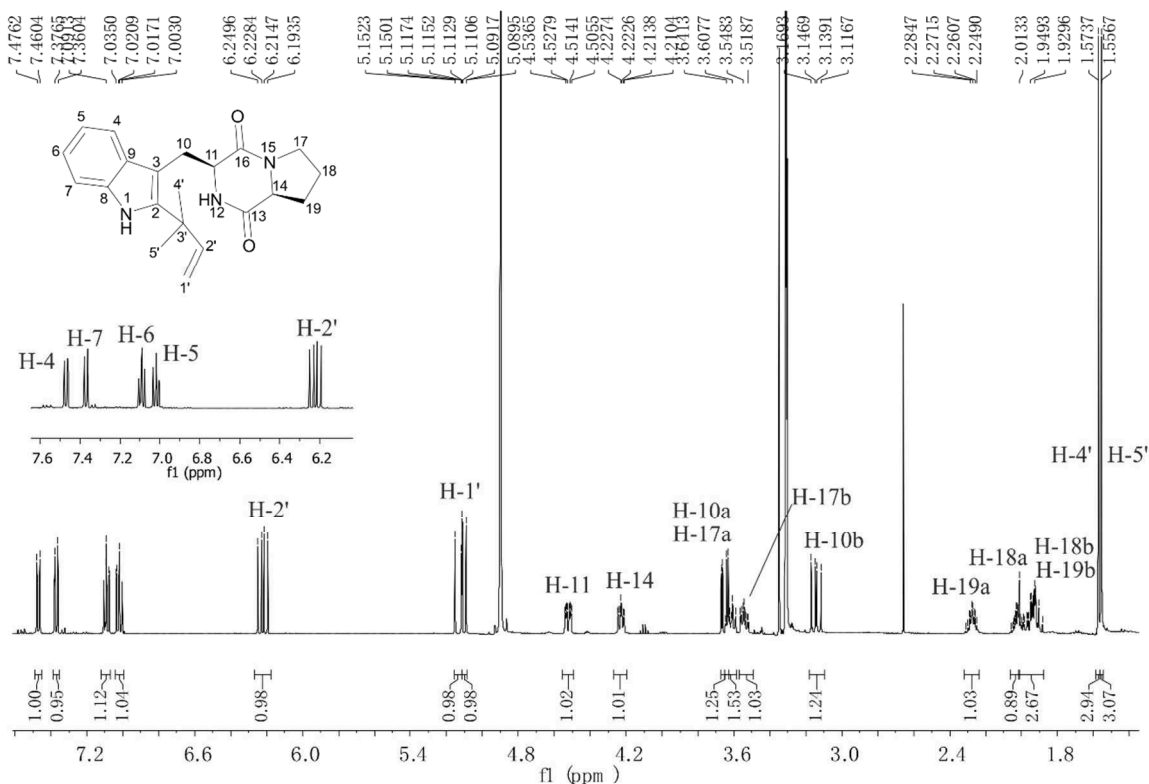


Abb.7-31: ^1H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produktes cyclo-2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26b) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM19 (*cdpC2PT*) in CD_3OD (500 MHz).

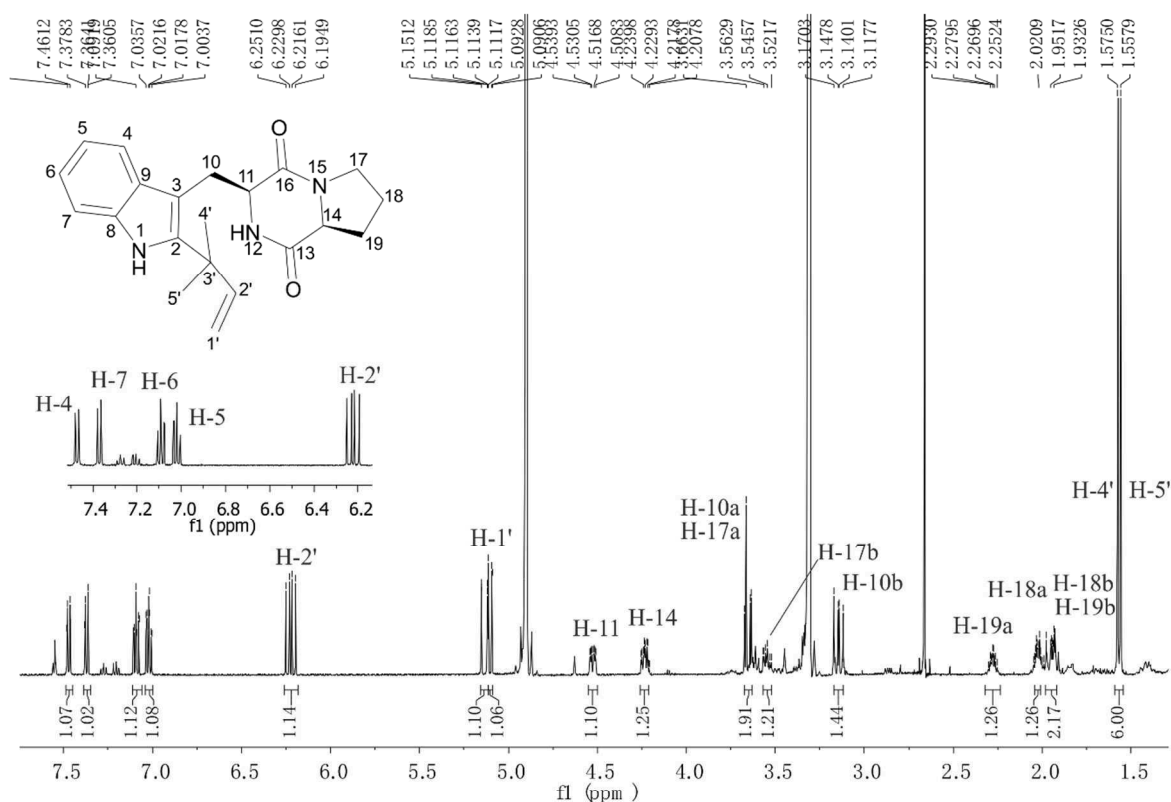


Abb.7-32: ^1H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produktes cyclo-2-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26b) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM24 (*cdpC3PT*) in CD_3OD (500 MHz).

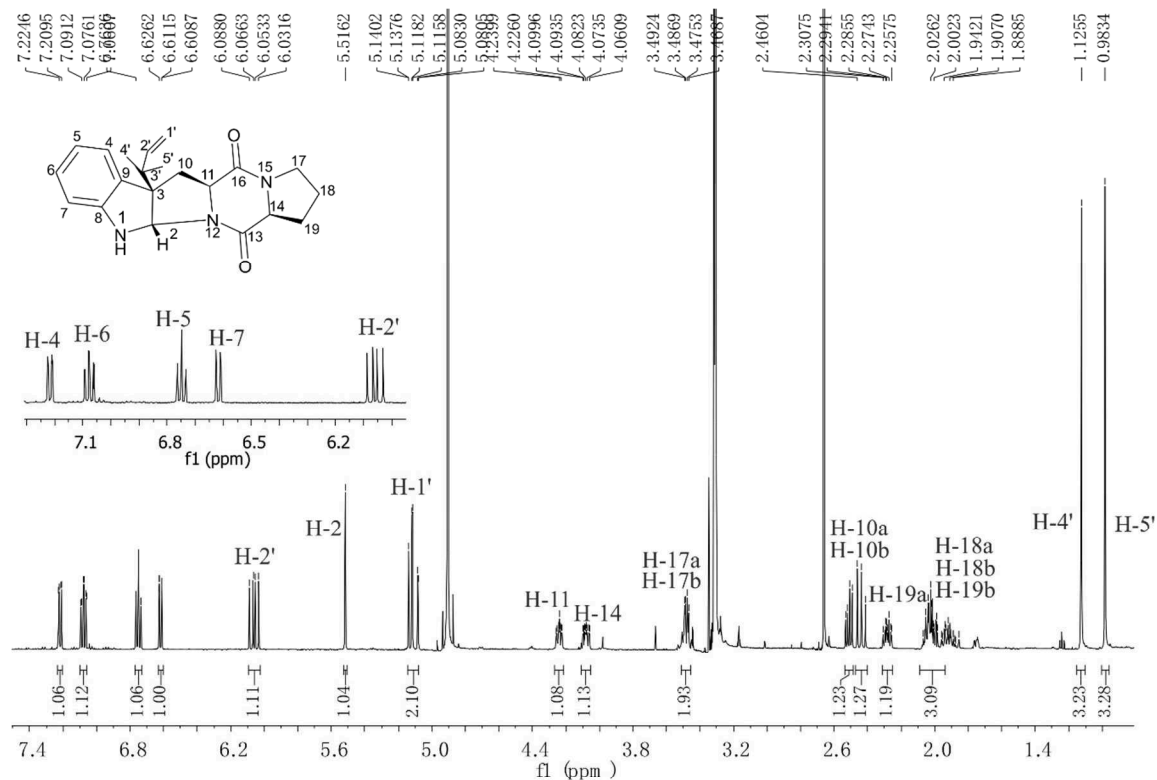


Abb.7-33: ^1H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produkts cyclo-3-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26c) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM24 (*cdpC3PT*) in CD_3OD (500 MHz).

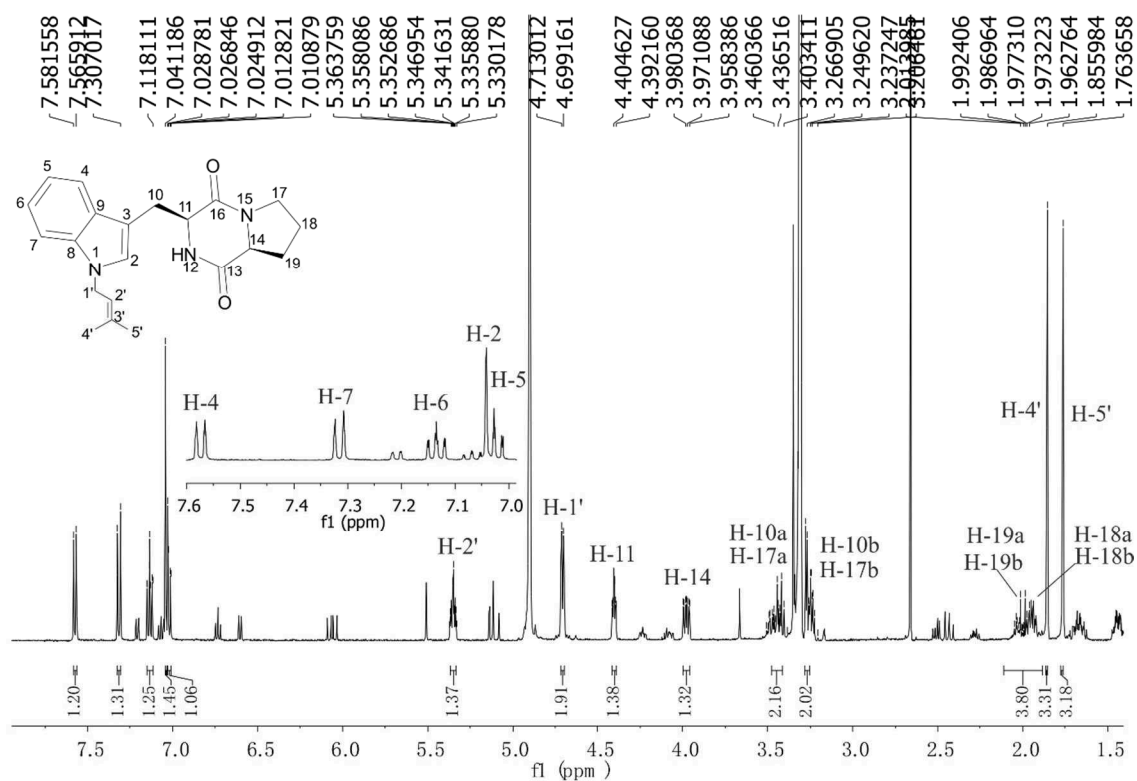


Abb.7-34: ^1H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produkts cyclo-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Pro (26d) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM24 (*cdpC3PT*) in CD_3OD (500 MHz).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit. Seine Tür stand für mich jederzeit offen und er nahm sich immer Zeit für Gespräche in denen wir zusammen neue Ideen und Probleme diskutiert haben. Auch danke ich ihm dafür, dass ich 2010 China kennenlernen durfte, dies war für mich eine unglaubliche Erfahrung.

Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Peter Lenz und Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch möchte ich für ihre sehr gute Betreuung innerhalb der Graduiertenschule vom LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (SynMikro) bedanken.

Dr. Kämpchen und Herr Newel danke ich für die Messung der ^1H -NMR-Spektren und Dr. Laufenberg und Frau Zitzer danke ich für die Durchführung und Hilfe im Rahmen der massenspektrometrischen Messungen.

Ein Dank geht natürlich auch an meine aktuellen und ehemaligen Institutskollegen Aili, Alex, Anika, Anne, Beate, Daniel, Edyta, Jennifer, Julia, Katja, Kirsten, Lena, Lennart, Mike, Nici, Nina, Ole, Peter, Soheil, Stefan, Sylwia, Viola, Wen-Bing und Xia.

Chrissy und Marco danke ich für die spannenden Spieleabende mit Knoten-Knut. Ich hoffe wir werden immer in Verbindung bleiben.

Thank you Rui for helping us in Guangzhou during our scientific exchange, I enjoyed our short time very much.

My lovely Suqin, I thank you so much for being such a good friend to me. I miss our “baking christmas cookies” hours and I hope we’ll meet again soon.

Meinen Freunden außerhalb des Labors, insbesondere Katja, Jenny, Maria und Sebastian möchte ich für ihre Geduld, Unterstützung und aufbauenden Worte bedanken.

Meinem Freund Carsten, der gleichzeitig auch mein Arbeitskollege und bester Freund ist, danke ich vom ganzen Herzen für seine Geduld, Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit, vor allem während meiner Krankheitsphase. Vielen Dank auch für deine positiven und negativen Äußerungen an meiner Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Danke das du immer für mich da bist und ich mich auf dich verlassen kann!

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern für die liebevolle Unterstützung und Förderung sowie ihre Geduld während der letzten Jahre herzlich bedanken. Ganz besonderer Dank gilt meiner Mom und Mathias für das kritische Korrekturlesen der Arbeit.

Curriculum vitae

Die Seite 187 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.